Zur Frage der Kopplung von Transkription und Translation im Lactose-Operon von Escherichia coli

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt
von

LOTHAR HÜBNER
aus Prag

1974

74 139

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546528_0062

Zur Frage der Kopplung von Transkription und Translation im Lactose-Operon von Escherichia coli

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Biologie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt
von

LOTHAR HÜBNER
aus Prag

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	17. Januar 1974
Dekan:	Prof. Dr. D. Sperlich
1. Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. D. Dütting
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Seyffert

aku- Fotodruck, 86 Bamberg, Färbergasse 8 R

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung	1
B. Ergebnisse	
1. Synthese und Nachweis von Lac-mRNA in verschiedenen E.coli Stämmen	8
2. Reduktion von Lac-mRNA bei Inkubation von Zellen mit Streptomycin, Puromycin und Chloramphenicol	12
2.1. Wirkungsweise der Antibiotika	12
a. Streptomycin	12
b. Puromycin	13
c. Chloramphenicol	14
2.2. Reduktion von Lac-mRNA durch Streptomycin	15
2.3. Reduktion von Lac-mRNA durch Puromycin	20
2.4. Reduktion von Lac-mRNA durch Chloramphenicol	22
2.5. Lac-mRNA-Synthese bei unterschiedlicher Pulslänge in Gegenwart von Chloramphenicol oder Puromycin	24
3. Hemmung der Proteinsynthese durch Chloramphenicol, Streptomycin und Puromycin	26
4. Einfluß von Streptomycin, Chloramphenicol und Puromycin auf die gesamte RNA-Synthese	28
4.1. Einfluß der Antibiotika auf die mRNA-Synthese	28
4.2. Einfluß der Antibiotika auf die ribosomale RNA-Synthese	30
4.3. Bestimmung des stabilen RNA-Anteils	32
5. Sedimentationsverhalten von pulsmarkierter RNA aus Antibiotika-behandelten Zellen	33
6. RNA-Synthese in einem in vitro-System	42
6.1. Hybridisierung von ^{3}H-RNA mit E.coli DNA	43
6.2. Hybridisierung von ^{3}H-RNA mit Lac-DNA	44
C. Zusammenfassung	48

D. Material und Methoden Seite

1. Material 51
1.1. Stämme 51
1.2. Chemikalien 52
1.3. Medien, Lösungen 52
2. Methoden 53
2.1. Pulsmarkierung von RNA in vivo 53
2.2. RNA-Synthese im in vitro-System 54
2.3. Extraktion markierter RNA 55
2.4. Isolierung ribosomaler RNA 55
2.5. Isolierung von E.coli DNA 55
2.6. Hybridisierungstechnik 56
a. Hybridisierung mit Lac-DNA 56
b. Bestimmung der Lac-mRNA 57
c. Hybridisierung mit E.coli DNA (D8) 57
2.7. Nachweis stabiler RNA (rRNA,tRNA) 58
2.8. Einbau von ^{3}H-Leucin in Bakterien 58
2.9. Charakterisierung der Größenverteilung von RNA 59
a. SDS-Sucrose-Gradienten 59
b. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren in Formamid 59
c. DMSO-Gradienten 60
d. Hybridisierung von RNA aus Gradientenfraktionen mit Lac-DNA und E.coli DNA 60

E. Literatur 61

A. Einleitung

Das Lactose-Operon von E.coli enthält die drei Strukturgene z, y und a mit der Information für die Enzyme ß-Galactosidase (ß-Gal), Galactosidpermease (Perm) und Thiogalactosidtransacetylase (Acetyl) (Abb. 1).

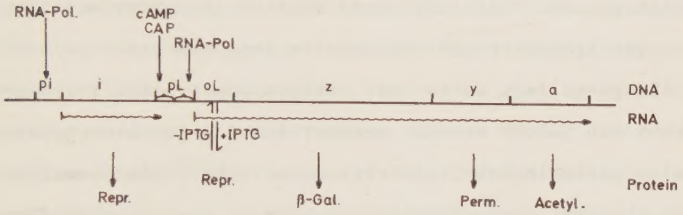


Abb. 1: Lactose-Operon in E.coli

Die Lac-Operon-Expression unterliegt einer negativen und einer positiven Kontrolle. Die Bindung des Repressors (i-Genprodukt) an den Operator (o_L) verhindert Transkriptions-Starts der DNA-abhängigen RNA-Polymerase am Promoter (p_L). ß-D-Galactosidderivate wie z.B. Isopropylthio-ß-D-Galactosid (IPTG) setzen durch Bindung an den Repressor seine Affinität zum Operator herab und heben die negative Kontrolle auf (1-3). Beim positiven Kontrollmechanismus hängt die Expression der Lac-Gene vom intrazellulären cAMP-Gehalt ab. Zusammen mit dem CAP-Protein (Katabolitgen-Aktivatorprotein) bindet cAMP an den i-proximalen Bereich des Promoters und führt so zur Transkription des Lac-Operons (4-6). Der Ausfall des cAMP-Systems reduziert in E.coli

die Lac-mRNA-Synthese um 98% (7). Das Galactose- und Arabinose-Operon haben als katabolische Gensysteme ebenfalls diese positive Kontrolle (8-10).

Mit einem von Zubay et al. (11, 12) entwickelten in vitro-Transkriptionssystem bestätigten de Crombrugghe et al. (13, 14) die beiden Kontrollmechanismen des Lac-Operons und erbrachten zugleich den Nachweis, daß in vitro eine spezifische Lac-Transkription ohne Proteinsynthese möglich ist. Eine strikte Kopplung von Transkription und Translation, wie sie 1964 von Stent (15) postuliert worden ist, trifft somit nicht zu. Einschränkend muß jedoch erwähnt werden, daß das in vitro-System noch keine optimale Lac-Transkription erlaubt. Konnte man nach IPTG-Induktion in vivo eine 350fach Zunahme der Lac-mRNA-Synthese feststellen (16), entsprach die Zunahme in vitro einem Faktor von etwa 4-5 (17, 18).

In vivo beträgt die Synthesegeschwindigkeit von Lac-mRNA bei 37°C etwa 40 Nukleotide/sec, in vitro,wie am Beispiel der Trp-mRNA-Synthese gezeigt worden ist, 3 Nukleotide/sec (19). In vivo ist das z-Gen somit 90 Sekunden nach Initiation, das gesamte Lac-Operon eine Minute später transkribiert (16). Ein Maximum an Enzymsynthese wird 4-5 Minuten nach Induktion des Lac-Operons erreicht. Da Lac-mRNA bei 37°C in etwa 2 Minuten zur Hälfte wieder abgebaut wird, bedeutet dies, daß die Inaktivierung des Lac-Messengers einsetzt, noch ehe seine Synthese beendet ist.Elektronenoptische Aufnahmen zeigten sehr eindrucksvoll wie Ribosomen während der Translation des Messengers diesen dicht bepacken und unmittelbar hinter der RNA-Polymerase mit der Proteinsynthese beginnen (20).

Ein wesentlicher Unterschied des in vivo-Systems gegenüber dem erwähnten in vitro-System ist folglich ein Transkriptions-Translationskomplex, den Lac-mRNA mit DNA, RNA-Polymerase und mit Peptidketten beladenen Ribosomen bildet.

In polaren Mutanten lösen sich Ribosomen mit ihren wachsenden Peptidketten an der Stelle des nonsense-Codons von der mRNA ab (21, 22). Die Folge davon ist eine sehr starke Abnahme des entsprechenden Messengers vor allem distal zum nonsense-Codon (23, 24). Untersuchungen an dem nicht der Katabolitrepression ausgesetzten Tryptophan-Operon führten zu zwei verschiedenen Erklärungen des polaren Effekts:

Morse et al.(25-29) nehmen an, daß infolge des Proteinsynthesestops an einem nonsense-Codon der zum nonsense-Codon distale Bereich hyperlabil ist. Fehlen die vor nukleolytischem Angriff schützenden Ribosomen, kann der distal zum nonsense-Codon synthetisierte Bereich endonukleolytisch angegriffen und sehr schnell abgebaut werden.

Imamoto et al. (30, 31) glauben dagegen, die Polarität mit einem vorzeitigen RNA-Synthesestop in Nachbarschaft des nonsense-Codons erklären zu können. Sie wiesen Trp-mRNA nur zwischen Promoter und nonsense-Codon nach. Versuche mit einer E.coli Mutante mit temperatursensitivem ribosomalem P10 Protein zeigten bei nicht permissiver Temperatur parallel zur Abnahme der Proteinsynthese eine entsprechende Abnahme an Trp-mRNA-Synthese, während die Gesamt-mRNA-Synthese nicht beeinflußt wurde (32). Das P10 Protein ist als Untereinheit des ribosomalen 30S Partikels wahrscheinlich an der Initiation der Proteinsynthese beteiligt (33, 34). Imamoto et al. schlossen daraus auf eine

Kopplung von Transkription und Translation beim Trp-Operon. Sie postulierten, daß bei einigen Operons eine kontinuierliche Transkription durch Proteinsyntheseinitiation und/oder durch das Wandern der Ribosomen auf der mRNA begünstigt wird.

Zu einer ähnlichen Schlußfolgerung kamen Craig (35) und Mackie & Wilson (36) in Experimenten mit einer temperatursensitiven Mutante des ribosomalen Translokationsfaktors G. Blockierung der Translokation bei der nicht permissiven Temperatur führte zu einer über 90%igen Hemmung der Trp-mRNA- bzw. Gal-mRNA-Synthese. Die Synthese der Gesamt-mRNA wurde dagegen nicht oder nur geringfügig beeinflußt.

Weitere vorgeschlagene Mechanismen zur Erklärung vorzeitigen RNA-Synthesestops bei Entkopplung von Transkription und Translation waren: z.B. der Ausfall RNA-Synthese stimulierender Faktoren, die strukturell ans Ribosom gebunden sind (37-39), oder die Behinderung der RNA-Polymerase durch wachsende mRNA-Ketten, wenn diese frei von Ribosomen sind (40). Ebenso vorstellbar ist das Auftreten von intermediären Hybriden aus DNA und wachsender mRNA, die nur durch Entlanglaufen der Ribosomen auf der mRNA aufgebrochen werden können (41).

Mit Hilfe von Antibiotika, die die Proteinsynthese hemmen, sollte es möglich sein zu entscheiden, ob eine Translation für eine effektive Transkription notwendig ist. So haben Varmus et al. (42) gleichzeitig mit Dütting und Hübner (43) den Einfluß von Chloramphenicol, Puromycin und Streptomycin auf die Transkription des Lac-Operons untersucht. Morse (44) hat den Einfluß von Chloramphenicol, Imamoto (41) neben den erwähnten Antibiotika den Einfluß von Fusidinsäure, Erythromycin und Tetracyclin auf

die Transkription der Trp-mRNA untersucht.

Gemeinsam zeigen alle Arbeiten eine drastische Senkung (> 90%) an nachweisbar synthetisierter Trp- oder Lac-mRNA durch diese Antibiotika. Morse und Varmus et al. führen die starke Abnahme an synthetisierter mRNA - wie den Effekt einer polaren Mutation auf die Synthese von RNA - auf raschen nukleolytischen Abbau zurück. Imamoto dagegen hat Evidenz für vorzeitigen RNA-Synthesestop:

Durch die Translokation des Tryptophan-Operons in den Bereich des sehr frühen N-Gens des Phagen λ (immediate early region) war es möglich, die Expression dieses Operons durch 2 Promotoren zu kontrollieren, durch den λ-Promoter des N-Gens und den Trp-Promoter (45). Man wußte, daß Chloramphenicol auf die Transkription der sehr frühen Gene von λ keinen Einfluß hat (46, 47). Begann die Expression des Trp-Operons am Trp-Promoter, so führte ein Proteinsynthesestop durch Zugabe von Chloramphenicol, Tetracyclin, Erythromycin oder Puromycin auch zum Transkriptionsstop des Trp-Operons. Stand das Trp-Operon dagegen unter der Kontrolle des λ-Repressors, zeigte eine Hemmung der Proteinsynthese durch diese Antibiotika keinen Einfluß auf die Transkription des Tryptophan-Operons ("read through" des Trp-Operons vom λ-Promoter her).

In Untersuchungen über die Größenverteilung von Trp-mRNA nach Inkubation von Zellen mit Antibiotika wies Imamoto in allen Fällen noch hochmolekulare Trp-mRNA nach (41). Weiter konnte er nachweisen, daß Fusidinsäure, Puromycin und Erythromycin den operator-proximalen Teil des Trp-Messengers weniger beeinflußten als den operator-distalen Bereich, steigende Konzentrationen

von Chloramphenicol oder Tetracyclin dagegen zu einer gleichmäßigen Abnahme aller Trp-mRNA-Moleküle führten. Die Ergebnisse sind nicht vereinbar mit der Interpretation von Morse und Varmus, die Reduktion spezifischer mRNA durch Antibiotika mit einem sehr raschen Abbau zu erklären.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der Translation auf die in vivo-Transkription der Lactose-Gene sowie auf die Transkription des gesamten E.coli-Genoms näher untersucht. In publizierten Versuchen (43) war gefunden worden, daß ein Block der Proteinsynthese durch Antibiotika die Lac-Transkription nahezu vollständig hemmt, während die Transkription des gesamten E.coli-Genoms unter vergleichbaren Bedingungen nur geringfügig reduziert wurde. Mit erweiterter Fragestellung wurden diese Untersuchungen in vivo und in einem in vitro-System fortgeführt. So wurde die Frage, ob für eine effektive Lac-Transkription die Translation notwendig ist, dahingehend geprüft, in welchem Maße Streptomycin, Chloramphenicol und Puromycin unter vergleichbaren in vivo-Bedingungen die Proteinsynthese hemmen und wieweit diese Hemmeffekte mit der entsprechenden Lac-mRNA-Reduktion korreliert sind.

Wenn die Reduktion spezifischer Messenger in Gegenwart von Antibiotikum auf vorzeitige Synthesestops zurückzuführen ist, sollte sich das durch Abnahme an hochmolekularer mRNA im Sedimentationsverhalten äußern. Aus diesem Grunde wurde die Größenverteilung von Lac-mRNA und Gesamt-mRNA in SDS-Sucrose-Gradienten bestimmt. In diesem Zusammenhang wurden auch verschiedene Sedimentationsverfahren einander gegenübergestellt.

Durch Kompetitionshybridisierung wurde zudem untersucht, ob die erwähnten Antibiotika auch auf die ribosomale RNA-Synthese einen Einfluß ausüben.

Weitere Versuche in einem den in vivo-Verhältnissen angepaßten in vitro-System sollten zeigen, ob der Nachweis der Lac-mRNA-Synthese auch dann gelingt, wenn die Proteinsynthese vollkommen defekt ist. Das System besteht aus lysierten Zellen, die alle hochmolekularen Komponenten etwa in Konzentrationen enthalten, wie sie in vivo vorliegen (48). Die Zugabe einer Reihe niedermolekularer Substanzen ermöglicht es in diesem System RNA- und DNA-Synthese durchzuführen. Es wurde die Frage gestellt, inwieweit die Gesamt-mRNA-Synthese reduziert ist und ob Chloramphenicol unter diesen Bedingungen noch einen Einfluß auf die RNA-Synthese ausübt.

B. Ergebnisse und Diskussion

1. Synthese und Nachweis von Lac-mRNA in verschiedenen E.coli Stämmen

Die Menge an Lac-mRNA in wachsenden E.coli Zellen hängt außer vom genetischen Zustand der Zellen (diploid oder haploid in Bezug auf das Lac-Operon) sehr stark von den Wachstumsbedingungen ab. Dabei ist die Art der C- und N-Quelle, bzw. das Katabolitniveau im Nährmedium von entscheidender Bedeutung. Eine gute C-Quelle wie Glucose stellt im Nährmedium ein hohes Katabolitniveau her und führt durch Senkung des intrazellulären cAMP-Gehalts in einer Bakterienkultur zur Katabolitrepression. Die Folge davon ist eine Reduktion der Transkriptionsstarts am Lac-Promoter, die durch exogen zugegebenes cAMP wieder aufgehoben werden kann (8). Optimale Bedingungen für die Synthese von Lac-mRNA sind demnach ein hoher cAMP-Spiegel, der durch eine schlechte C-Quelle erreicht wird und eine gute N-Quelle, die eine hohe Biosyntheserate erlaubt.

In allen beschriebenen Experimenten wurde ein Tris-Glycerin-Casaminosäure-Medium (TGlyC) verwendet. Glycerin ist eine solche relativ schlechte C-Quelle, während NH_4Cl neben den Aminosäuren im TGlyC-Medium eine gute N-Quelle darstellt. Die Lac-Expression exponentiell wachsender Zellen (2-5 x 10^8 Zellen/ml) wurde mit IPTG induziert und die neusynthetisierte RNA 30 Minuten nach Induktion mit ^{3}H-Uridin bei 30°C pulsmarkiert (Pulslänge max. 1 Min.). In dieser Zeit hat sich ein Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau der RNA eingestellt.

Um den Lac-mRNA-Gehalt der Gesamt-RNA zu bestimmen, wurde die isolierte pulsmarkierte RNA mit einem Überschuß von

l-Einzelstrang-DNA aus λplac5- und λcI- (oder λcI857-) Phagen hybridisiert und der λcI-Wert vom λplac5-Wert subtrahiert. Im λplac5-Phagen ist die Lac-DNA im Vergleich zum Anteil des Lac-Abschnitts der Gesamt-DNA von E.coli ∿100fach angereichert.

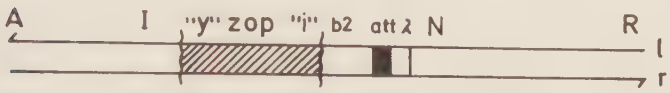


Abb. 2: Phage λplac5

Wie der Abb. 2 zu entnehmen ist, reicht das Lactose-Operon in diesem Phagen etwa von der Mitte des i-Gens bis zur Mitte des y-Gens. Das sind ca. 80% der Strukturgene des gesamten Lactose-Operons. Der Phage trägt außer den Lac-Genen keine weiteren bakteriellen DNA Stücke (16, 49). Da in vivo synthetisierte Lac-mRNA nur zum λplac l-Strang komplementär ist, wird dieser Strang bei der Hybridisierung mit pulsmarkierter RNA bevorzugt mit Lac-mRNA hybridisieren. Die Phagen λcI und λcI857 unterscheiden sich vom Wildtyp λ nur durch Punktmutationen (50). Die Hybridisierung von l-Einzelstrang DNA dieser Phagen mit pulsmarkierter RNA aus E.coli erfaßt die mit λ-DNA hybridisierenden Sequenzen. Bei der Hybridisierung von pulsmarkierter RNA mit λplac l-Strang bzw. λcI l-Strang (oder λcI857 l-Strang) entspricht damit die Differenz der Hybridisierungswerte ausschließlich Lac-mRNA, die während der Pulsmarkierung synthetisiert worden ist.

RNA isoliert aus Stamm	Dauer der Puls-markierung (Sek.bei 30°C)	% eingesetzte ^{3}H-RNA hybridisiert mit Lac-DNA (λplac 1 - λ1-Strang)	
		+ cAMP	- cAMP
A 19-15	30	0.89	0.78
D 27 (diploid für lac)	10		1.9
	30	2.0+)	1.7+)
D 28 (U 118) (diploid für	10		0.17
lac)	30		0.16
	60		0.10
D 28 (nicht induziert)	30		0.01
D 53	10	0.90	
	30	0.85	
	60	0.72	
	5x	0.22	
	10x	0.17	
	20x	0.11	
D 55 (U 118)	10		0.08
	30		0.06
	60		0.07
D 55 (nicht induziert)	30		0.006
D 57	10		1.10
	30		1.14
	60		1.20
D 57 (nicht induziert)	30		0.03
D 61	30	1.25+)	0.96+)
D 62 (UV5)	30		0.55+)
D 63 (suA$^-$)	30	0.98	0.84
D 69 (str^R)	30		0.45+)
D 71 (suA$^+$)	30	0.91+)	0.71

+) Mittelwert aus mehreren Messungen

x Minuten

Tab. 1: Lac-mRNA-Synthese in verschiedenen E.coli-Stämmen. Gleiche Volumina von Kulturen der E.coli-Stämme wurden 30 Minuten nach IPTG-Induktion (1 mM) zu den angegebenen Zeiten mit ^{3}H-Uridin (20-30 Ci/mM; Endkonz. 4 µCi/ml) pulsmarkiert. cAMP (7 mM) wurde 10 Minuten vor Pulsmarkierung zugegeben. Jeweils konstante Mengen an pulsmarkierter RNA (3-4 x10^4 cpm; 6-8000 cpm/ µg RNA) wurden mit 2-5 µg λplac 1- bzw. λc 1-Strang DNA in 0.2 ml 2xSSC, 2%-igem Phenol, 4 h bei 65°C hybridisiert.

In der Tabelle 1 ist eine Zusammenstellung solcher Hybridisierungswerte von pulsmarkierter RNA aus verschiedenen E.coli-Stämmen wiedergegeben.

Bei Stämmen, die diploid für das Lac-Operon sind, hybridisieren zwischen 1.6% und 2.0% der synthetisierten RNA mit Lac-DNA, bei haploiden Stämmen zwischen 0.7% und 1.2%. Die Menge an Lac-mRNA, die nach Aufhebung der Katabolitrepression (durch Zugabe von cAMP) synthetisiert wird, liegt dabei um 14-23% höher als der in Abwesenheit von cAMP erhaltene Wert.

Die beobachtete Abnahme an nachweisbarer Lac-mRNA im Stamm D53 bei Verlängerung der Markierungszeit ist auf den größeren Umsatz von mRNA gegenüber stabiler RNA (rRNA, tRNA) zurückzuführen (51). In den Stämmen D28 und D55 mit der extrem polaren Mutation U 118 im z-Gen ist der Lac-mRNA Anteil gegenüber den isogenen Lac^+-Stämmen auf 9 bzw. 7% reduziert. Die Werte liegen noch über dem Nullwert nicht induzierter Kontrollen und verändern sich bei Verlängerung der Pulszeit nicht wesentlich. Wäre die starke Abnahme an Lac-mRNA bei den beiden Stämmen nur auf raschen nukleolytischen Abbau zurückzuführen, so hätte man bei den sehr kurzen Pulszeiten erheblich mehr Lac-mRNA finden müssen. Der Stamm D62 (UV5) trägt eine Doppelmutation im Lac-Promoter ("second site reversion" im Promoter der Promotermutante L8) und unterliegt nicht der Katabolitrepression (52). L8 ist eine Punktmutation im i-Gen-proximalen Teil des Promoters (Abb. 3). Sie beeinflußt die Bindung des CAP-Proteins an diesen Teil des Promoters und setzt die Induzierbarkeit des Lac-Operons stark herab (53).

Durch die zweite Mutation (UV5) innerhalb des Lac-Promoters ändert sich die Bindungsstelle für die RNA-Polymerase so, daß

eine Bindung der RNA-Polymerase an den Lac-Promoter auch ohne CAP-Protein möglich ist. Die UV5-Mutante synthetisiert etwa halb soviel Lac-mRNA wie der parentale Wildstamm D61.

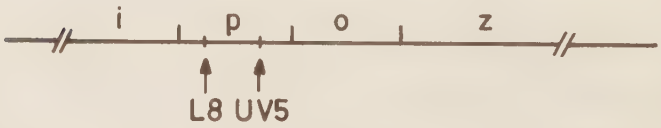


Abb. 3: Lac-Promotermutante UV5 (D62)

2. Reduktion von Lac-mRNA bei Inkubation von Zellen mit Streptomycin, Puromycin und Chloramphenicol

2.1. Wirkungsweise der Antibiotika

a) Streptomycin: Streptomycin führt in einer wachsenden Bakterienkultur rasch zur Hemmung der Proteinsynthese. In in vitro-Experimenten konnte dabei die Freisetzung von f-met-tRNA von der Peptidyl-tRNA-Bindungsstelle (P-Site) des 70S-Ribosomen-mRNA-Initiationskomplexes nachgewiesen werden, noch ehe Peptidelongation stattfindet. Es kommt dabei zur Destabilisierung von Polysomen, verbunden mit einer Zunahme an 70S-Monosomen bzw. mit einer Abnahme freier ribosomaler 30S- und 50S-Untereinheiten (54, 55). Neuere Untersuchungen von Wallace et al. (56) zeigten, daß diese "Streptomycinribosomen", obgleich an ihnen kein Protein mehr synthetisiert werden kann, keinesfalls inert sind. Vielmehr sind diese Ribosomen zur cyklischen abortiven

Reinitiation fähig. Dies führt in vermindertem Maße zur Bildung von Polysomen, wobei die polysomale RNA mit normaler Geschwindigkeit synthetisiert wird. Die Freisetzung der Ribosomen nach Blockierung der Peptidkettenverlängerung durch Streptomycin erfolgt nur langsam. Der limitierende Faktor für die Reinitiation, also die Bildung des 70S-mRNA-Initiationskomplexes, scheint die erforderliche Dissoziation der "Streptomycinribosomen" in die 30S- und 50S-Untereinheiten durch den Dissoziationsfaktor (DF = IF_3) zu sein (57). Ribosomen, die aktiv Protein synthetisieren, unterliegen ständigen Konformationsänderungen (58). Eine Behinderung dieser Transformationen durch Streptomycin bzw. eine Stabilisierung der Konformation, bei der gerade Streptomycin am Ribosom gebunden ist, könnte die antagonistische Wirkung von Streptomycin gegenüber dem Dissoziationsfaktor erklären.

b) Puromycin: Puromycin ist als Antagonist von Aminoacyl-tRNA Akzeptor wachsender Peptidketten und löst diese durch kovalente Bindung von den Ribosomen ab (63, 66). Es wirkt dabei wie Chloramphenicol von der "A-Site" des Peptidyl-Transferasezentrums aus auf die Peptidyl-tRNA (P-Site) (61, 67). Im Gegensatz zu Chloramphenicol lockert jedoch Puromycin durch das Loslösen der Peptidketten die Wechselwirkung der ribosomalen Untereinheiten zueinander. Die Folge ist eine Destabilisierung von Polysomen (68, 69). Die Frage, ob dabei beide ribosomalen Untereinheiten von der mRNA abfallen, ist noch offen. Sicher ist, daß sich die ribosomalen 50S-Partikel in Gegenwart von Puromycin in verstärktem Maße vom Ribosomen-mRNA-Komplex loslösen. Lac-mRNA (42) und Trp-mRNA (41) werden nach Zugabe von Puromycin beschleunigt abgebaut.

Dieser Befund läßt sich damit erklären, daß die mRNA einem nukleolytischen Angriff leichter zugänglich ist. Eine Abnahme oder Hemmung des Translations-Initiationsfaktors IF_3 bei Inkubation von Bakterien mit Puromycin konnte eindeutig ausgeschlossen werden (65).

c) Chloramphenicol: Chloramphenicol hemmt die bakterielle Proteinsynthese stark, aber reversibel, durch stöchiometrische Bindung an die ribosomale 50S-Untereinheit (59) am Peptidyl-Transferasezentrum (60). Nierhaus und Nierhaus (61) konnten kürzlich direkt zeigen, daß die Chloramphenicolbindung am ribosomalen L16-Protein erfolgt und daß diese Bindungsstelle ausschließlich zur Aminoacyl-tRNA-Bindungsstelle (A-Site) des Peptidyl-Transferasezentrums gehört. Sie wiesen nach, daß ein CCA-Aminoacylrest die Bindung von Chloramphenicol an die 50S-Untereinheit ebenso stark hemmt wie Puromycin. Dagegen wurde die Bindung einer intakten Aminoacyl-tRNA durch Chloramphenicol nur teilweise verhindert. Diese Behinderung funktioneller Anlagerung des Aminoacylendes von Aminoacyl-tRNA an die "A-Site" führt zur Hemmung der Transpeptidierung. Gurgo et al. (62) wiesen bei 95%iger Hemmung der Proteinsynthese durch Chloramphenicol 30 Minuten lang noch die Bildung von Polysomen nach. Sie schlossen daraus auf die Entkopplung von Transpeptidierung und Translokation.

Das Entlanggleiten der Ribosomen auf dem Messenger erfolgt in Gegenwart von Chloramphenicol wahrscheinlich langsamer (63) und könnte den verzögerten Abbau von Polysomen erklären. Varmus et al. (42) hatten festgestellt, daß die Halbwertszeit von

bereits synthetisierter Lac-mRNA durch Zugabe von Chloramphenicol erheblich verlängert wird. Young und Nakada (64) wiesen 1971 darauf hin, daß die Hemmung der Proteinsynthese durch Chloramphenicol mit einer allmählichen Abnahme an Translations-Intitiationsfaktoren verbunden ist. Legault-Demare et al. (65) bestätigten jetzt diese Versuche und konnten direkt zeigen, daß es sich dabei um eine selektive Abnahme an IF_3 handelt.

2.2. Reduktion von Lac-mRNA durch Streptomycin

Steigende Streptomycinkonzentrationen führen 5 Minuten nach Antibiotikumzugabe zu einer linearen Abnahme an Lac-mRNA (Abb. 4). Die ∿ 70%ige Reduktion wird durch Streptomycindosen >160 µg/ml nur noch geringfügig beeinflußt.

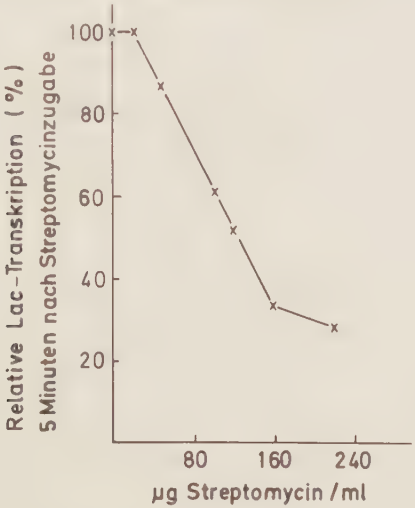


Abb. 4: Einfluß von Streptomycin auf die Lac-Transkription (Konzentrationsabhängigkeit). Streptomycin wurde zu gleichen Volumina einer Kultur des Stammes D27 30 Minuten nach IPTG Induktion gegeben. Die Kontrolle erhielt kein Streptomycin. Pulsmarkierung erfolgte bei 32 °C zwischen 4 und 5 Minuten nach Streptomycinzugabe.

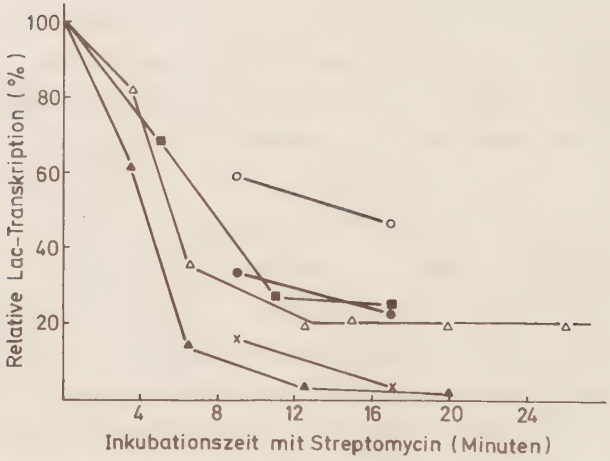


Abb. 5: Einfluß von Streptomycin auf die Lac-Transkription (Zeitabhängigkeit)
Gleiche Volumina von Kulturen der Stämme D27 (-△-, + cAMP; -▲-, - cAMP), D62 (-■-, - cAMP), D70 (-●-, + cAMP; -x-, - cAMP), D71 (-o-, + cAMP) erhielten 30 Minuten nach IPTG-Zugabe Streptomycin (100 µg/ml), 3 Minuten vor Streptomycinzugabe cAMP (7 mM). Die Pulsmarkierung (30 Sekunden bei 30°C) wurde zu den eingezeichneten Zeiten beendet. Kontrollen: - Streptomycin, ± cAMP (Tab. 1).

In der Abb. 5 ist der Einfluß von Streptomycin (100 µg/ml) auf die Lac-Transkription in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer wiedergegeben. Bei den Stämmen D27 und D70 ist die relative Lac-Transkription nach etwa 12 Minuten Streptomycineinwirkung in Gegenwart von cAMP auf ein Plateau von 20% des Ausgangswertes reduziert, während in Abwesenheit von cAMP nur noch 3% nachweisbar sind.

Der Stamm D62 (UV5) unterliegt auf Grund der bereits beschriebenen Promotermutationen nicht der mediumabhängigen und antibiotikainduzierten Katabolitrepression. Werden Zellen dieses Stammes mit Streptomycin inkubiert, so wird die Lac-Transkription in 10 Minuten auf ein Plateau von 26% reduziert. 70-80% der streptomycininduzierten Reduktion der Lac-Transkription können somit in den erwähnten Stämmen nicht mit Katabolitrepression erklärt werden.

Der Stamm D71 unterscheidet sich vom isogenen Stamm D70 durch ein mutiertes suA-Allel (suA^+) (70). Dieses Allel supprimiert die polaren Effekte von amber-, ochre- und frameshift-Mutationen. Doch während die bekanntesten Suppressoren auf Grund veränderter tRNA-Moleküle den Wildtyp simulieren, soll das nicht mutierte suA-Allel (suA^-) nach Morse, Primakoff, Guertin (26, 28) und Kuwano et al. (29) für eine der Endonukleasen codieren, die den Abbau von mRNA einleiten. Hat ein endonukleolytischer Angriff einmal stattgefunden, soll es dann sehr rasch durch exonukleolytische Spaltungen zum vollständigen Abbau der mRNA kommen.

In stark polaren Mutanten lösen sich die Ribosomen an der Stelle des nonsense-Codons vom Messenger ab. Es entstehen ungeschützte RNA-Stellen, die ein geeignetes Substrat für die "suA-Endonuklease" sein sollten. Einen solchen suA-Effekt konnten Morse et al. (26, 29) in Experimenten mit den Stämmen D70 (suA^-) und D71 (suA^+) nachweisen. Die beiden Stämme haben eine stark polare ochre-Mutation (E9851) im ersten Strukturgen E (Anthranilat-Synthetase) des Tryptophan-Operons. Während aber im Stamm D70 der Trp-mRNA-Gehalt sehr stark reduziert war, hob die suA-Mutation im D71 den polaren Effekt größtenteils auf, die Menge an

synthetisierter Trp-mRNA wurde nicht wesentlich reduziert. Ebenso hob das inaktive suA-Genprodukt (suA^+) den reduzierenden Einfluß von Chloramphenicol auf Trp-mRNA nahezu vollständig auf.

In der Tabelle 2 wird dargestellt, welchen Einfluß das suA-Genprodukt auf die Lac-mRNA-Synthese in den Stämmen D70 (suA^-) und D71 (suA^+) ausübt, wenn diese in Gegenwart von Streptomycin stattfand. 17 Minuten nach Streptomycinzugabe beträgt die Lac-mRNA-Reduktion bei D70 97%, bei D71 80%. Davon sind bei D70 20%, bei D71 26% der Katabolitrepression zuzuschreiben. Es akkumulieren somit im Stamm D71 mit inaktiver "Endonuklease" nur etwa 20% mehr Lac-mRNA als in D70. Würde der "suA-Endonuklease" die Bedeutung zukommen, wie sie von Morse postuliert worden war, hätte man bei D71 erheblich mehr Lac-mRNA finden müssen. Dennoch kann ein rascher Abbau als hauptsächliche Ursache für die beschriebene Reduktion von Lac-mRNA durch Streptomycin nicht ausgeschlossen werden. Es ist anzunehmen, daß nicht nur eine Endonuklease am Abbau von mRNA beteiligt ist.

Keinen Einfluß auf die Lac-Transkription zeigt Streptomycin im streptomycinresistenten Stamm D69 (Abb. 6). Chloramphenicol und Puromycin üben hingegen in diesem Stamm den gleichen Einfluß aus wie in streptomycinsensitiven Stämmen. Dies weist auf das Mitwirken der Ribosomen am Reduktionsprozeß der Lac-Transkription durch Antibiotika hin.

Stamm	cAMP (mM)	Strep. (µg/ml)	Pulsmarkierung zur Zeit nach Zugabe v. Strep. (Min.)	Eingesetzte ^{3}H-RNA ($cpm \cdot 10^4$)	% eingesetzte ^{3}H-RNA hybridisiert mit Lac-DNA (λplac 1-λ1-Strang)	relative Lac-Transkription (%)
D70 (suA^-)	-	-	12-13	42.5	0.60	100
	-	100	3- 4	50.7	0.40	66
	-	100	8- 9	42.7	0.10	17
	-	100	16-17	45.3	0.02	3
D70	7	-	12-13	41.6	1.39	100
	7	100	3- 4	47.9	0.90	65
	7	100	8- 9	49.4	0.47	34
	7	100	16-17	39.2	0.32	23
D71 (suA^+)	-	-	12-13	25.5	0.48	100
	-	100	3- 4	47.6	0.42	87
	-	100	8- 9	46.4	0.21	44
	-	100	16-17	33.2	0.095	20
D71	8	-	12-13	18.3	0.97	100
	8	100	3- 4	32.9	0.96	99
	8	100	8- 9	32.8	0.57	59
	8	100	16-17	25.4	0.445	46

Tab. 2.: Die Stämme D70 und D71 wuchsen in TGlyC-Medium, das Threonin und Tryptophan (je 40 µg/ml) enthielt. Streptomycin wurde nach 30 Minuten IPTG-Induktion zugegeben und gleiche Teile der Kulturen bei 32°C wie angegeben pulsmarkiert. cAMP war 4 Minuten vor Streptomycin zugegeben worden. Sonstige Bedingungen wie in Tab. 1.

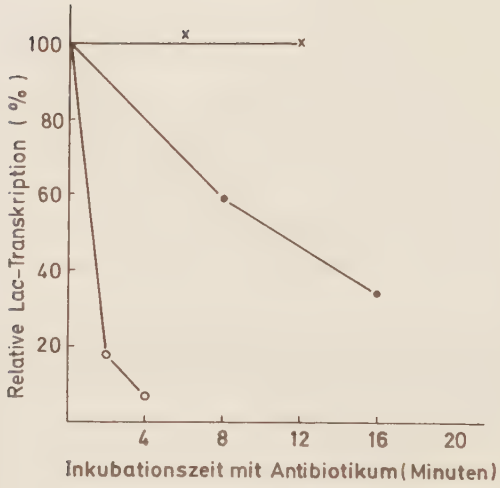


Abb. 6: Einfluß von Antibiotika auf die Lac-Transkription des streptomycinresistenten Stammes D69. Gleiche Volumina einer Bakterienkultur des Stammes D69 erhielten 30 Minuten nach IPTG-Zugabe Streptomycin (150 µg/ml) -x-, Chloramphenicol (150 µg/ml) -o- und Puromycin (250 µg/ml) -●-. Die Pulsmarkierung (30 Sekunden bei 30°C) wurde zu den angegebenen Zeiten beendet. Kontrolle: ohne Antibiotikum (Tab. 1).

2.3. Reduktion von Lac-mRNA durch Puromycin

Puromycin reduziert nach 20 Minuten Einwirkung im Stamm A19-15 bei einer Dosis >400 µg/ml noch deutlich die Lac-mRNA-Synthese (Abb. 7). Erst bei einer Puromycinkonzentration von 800 µg/ml ist die Lac-mRNA-Synthese auf etwa 20%, in Abwesenheit von cAMP auf etwa 2% reduziert. Wahrscheinlich erklärt das relativ schlechte Eindringen von Puromycin in die Zellen, warum bei so hohen Puromycinkonzentrationen kein Plateau der Lac-Transkription zu finden ist.

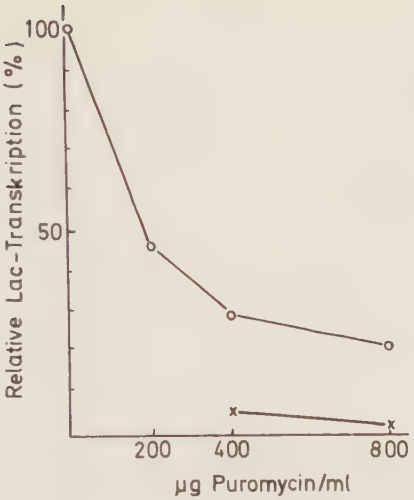


Abb. 7: Einfluß von Puromycin auf die Lac-Transkription (Konzentrationsabhängigkeit).
Gleiche Volumina einer Bakterienkultur des Stammes A19-15 erhielten 30 Minuten nach IPTG-Induktion 200, 400 oder 800 µg/ml Puromycin. Pulsmarkierung (30 Sekunden bei 30°C) erfolgte 20 Minuten nach Puromycinzugabe. cAMP (7 mM) wurde 5 Minuten vor Pulsmarkierung zugegeben (-o-, + cAMP; -x-, - cAMP). Kontrolle: - Puromycin, ± cAMP (Tab. 1).

In der Abb. 8 ist die Wirkung von 250 µg/ml Puromycin auf die Lac-Transkription verschiedener Stämme in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer dargestellt. Nach 20 Minuten Puromycineinwirkung ist die Lac-Transkription bei D61 auf <5%, bei D63 auf <10% reduziert. cAMP im Medium führt hier zu einer stärkeren Aufhebung der Lac-RNA-Reduktion als bei Inkubation der Zellen mit Streptomycin oder Chloramphenicol beobachtet wird. So beträgt die Lac-Transkription in Gegenwart von Puromycin und cAMP bei den Stämmen D61, A19-15 und D62 etwa 40%, bei D63 64% und D71 etwa 80% des Kontrollwertes.

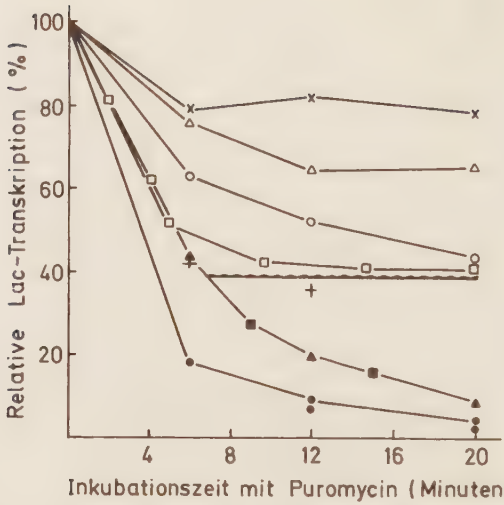


Abb. 8: Einfluß von Puromycin auf die Lac-Transkription (Zeitabhängigkeit).
Gleiche Teile von Kulturen der Stämme D27(-■-, - cAMP), D61 (-o-, + cAMP; -●-, - cAMP), D62 (-+-, - cAMP), D63 (-▵-, + cAMP; -▲-, - cAMP), D71 (-x-, + cAMP) und A19-15 (-□-, + cAMP) erhielten 30 Minuten nach IPTG-Induktion Puromycin (250µg/ml), 3 Minuten vor Puromycinzugabe cAMP (7mM). Die Pulsmarkierung (30 Sekunden bei 30°C) wurde zu den eingezeichneten Zeiten beendet.
Kontrollen: - Puromycin, ± cAMP (Tab. 1).

2.4. Reduktion von Lac-mRNA durch Chloramphenicol

Chloramphenicol zeigt den stärksten Einfluß auf die Lac-mRNA-Synthese (Abb. 9). 100 µg/ml reduzieren die Lac-mRNA-Synthese in den Stämmen D27 und D61 innerhalb von 4 Minuten auf ein Plateau von 14%, bei Fehlen von cAMP im Nährmedium auf 2%. Etwa 85% der chloramphenicolbedingten Reduktion von Lac-mRNA können damit nicht auf Katabolitrepression zurückzuführen sein.

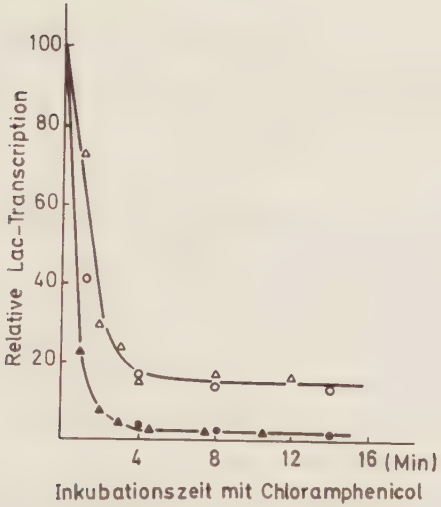


Abb. 9: Einfluß von Chloramphenicol auf die Lac-Transkription (Zeitabhängigkeit).
Gleiche Teile von Bakterienkulturen der Stämme D27 (-▲-, + cAMP; -▲-, - cAMP) und D61 (-o-, + cAMP; -●-, - cAMP) erhielten 30 Minuten nach IPTG-Induktion Chloramphenicol (100 µg/ml). cAMP (7 mM) wurde 3 Minuten vor Chloramphenicol zugegeben. Die Pulsmarkierung (30 Sekunden bei 30°C) wurde zu den eingezeichneten Zeiten beendet.
Kontrollen: - Chloramphenicol, ± cAMP (Tab. 1).

Die Menge an Lac-mRNA, die in Gegenwart von Antibiotikum synthetisiert wird, ist somit abhängig von der Art des Antibiotikums, dessen Konzentration, der Inkubationsdauer und von der Konzentration an exogen zugegebenem cAMP. Findet die Lac-Synthese im gleichen aber antibiotikumfreien Nährmedium statt, so ist der "cAMP-Effekt" schwächer ausgeprägt. Es ist deshalb anzunehmen, daß alle drei Antibiotika durch Hemmung der Proteinsynthese das Katabolitniveau im Medium während der Inkubation erhöhen und - durch simultane Erniedrigung des cAMP-Spiegels - Lac-Transkriptionsstarts um 30-60% herabsetzen.

Wahrscheinlich ist der besonders starke Effekt des cAMPs bei Inkubation mit Puromycin auf die längere Inkubationszeit zurückzuführen.

2.5. Lac-mRNA-Synthese bei unterschiedlicher Pulslänge in Gegenwart von Chloramphenicol oder Puromycin

Der reduzierende Einfluß der Antibiotika auf Lac-mRNA, der nicht mit Katabolitrepression erklärt werden kann, ist entweder auf RNA-Synthesestops und/oder auf raschen Abbau der mRNA-Moleküle zurückzuführen. Ein beschleunigter Abbau wäre denkbar, wenn ungeschützte Bereiche der mRNA einem nukleolytischen Angriff bevorzugt ausgesetzt sind. Solche labilen mRNA-Stücke könnten z. B. synthetisiert werden, wenn zwischen der RNA-Polymerase und den auf der mRNA am weitesten vorangerückten Ribosomen größere Lücken entstehen oder wenn sich Ribosomen schneller von der mRNA ablösen.

Eine Möglichkeit hyperlabile mRNA durch sehr kurze Markierungszeiten nachzuweisen, wurde von Morse und Yanofsky (25) in Untersuchungen über Effekte polarer Mutationen im Tryptophan-Operon beschrieben. Sie konnten in Stämmen mit einer polaren Mutation im ersten oder zweiten Strukturgen des Tryptophan-Operons bei sehr kurzen Pulszeiten Trp-mRNA in Konzentrationen nachweisen, die dem Wildtyp entsprachen, während längere Pulse zu einer sehr starken Abnahme an Trp-mRNA führten. Da unterschiedliche Pulslängen im Wildtyp nicht zu einer derartigen Abnahme führten, erklärten die Autoren ihre Befunde mit raschem endo- und exonukleolytischem Abbau ungeschützter RNA.

Im Widerspruch zu diesen Befunden stehen die bereits beschriebenen Versuche mit der extrem polaren Mutation U118 im z-Gen der Stämme D28 und D55 (Tabelle 1).

Hier war die Lac-Synthese unter "steady state" Bedingungen bei Pulszeiten von 10, 30 und 60 Sekunden Dauer nahezu gleichmäßig stark (>90%) reduziert, ein hyperlabiler Messenger konnte nicht nachgewiesen werden. Da in analogen Versuchen mit Lac^+-Stämmen (Tab. 1) die Synthese von Lac-mRNA weitgehend unabhängig von der Pulslänge war, stellt sich die Frage, ob in extrem polaren Mutanten - im Gegensatz zu schwachen polaren Mutanten - die mRNA-Synthese oft und vorzeitig unterbrochen, die RNA aber normal abgebaut wird. Nach Imamoto (41) sollte unter solchen Bedingungen die nachweisbare Menge an mRNA niedrig sein, jedoch konstant bleiben, wenn die Pulszeiten verkürzt werden.

Nimmt man an, daß in Gegenwart von Antibiotikum hyperlabile Lac-mRNA synthetisiert wird, so sollte mit zunehmender Pulslänge eine ähnlich starke Abnahme an Lac-mRNA gefunden werden, wie sie am Beispiel der Trp-mRNA gezeigt wurde.

Der Tabelle 3 kann entnommen werden, daß dies nicht zutrifft. RNA, die in Gegenwart von Chloramphenicol oder Puromycin 20, 40 oder 60 Sekunden lang markiert worden war, hybridisiert mit Lac-DNA zu 0.11% (Chloramphenicol-Experiment) bzw. zu 0.20% (Puromycin-Experiment).

Die reduzierten aber konstanten Hybridisierungswerte sprechen gegen die Entstehung hyperlabiler Lac-mRNA. Ein beschleunigter Abbau neusynthetisierter Lac-mRNA ist damit in Frage gestellt. Eine mögliche Erklärung ist, daß sich in Gegenwart proteinsyn-

thesehemmender Antibiotika ein Gleichgewicht zwischen Transkriptionsstarts und Abbau einstellt, wobei die Transkription oft und vorzeitig unterbrochen wird.

RNA isoliert aus Stamm	Dauer der Pulsmarkierung (Sek. bei 30°C)	% eingesetzte ^{3}H-RNA hybridisiert mit Lac-DNA(λplac 1 - λc 1 Strang) + Chloramph.	+ Puro.	- Antibiotikum
D53	10	-	-	0.90
	20	0.113	0.201	-
	30	-	-	0.85
	40	0.108	0.198	-
	60	0.111	0.198	0.72

Tab. 3: Lac-mRNA-Synthese bei unterschiedlicher Pulslänge in Gegenwart von Chloramphenicol oder Puromycin. Gleiche Volumina einer Kultur des Stammes D53 erhielten 20 Minuten nach IPTG-Induktion (1 mM) Chloramphenicol (150 µg/ml) oder Puromycin (400 µg/ml), 3 Minuten vor Antibiotikumzugabe cAMP (7 mM). Pulsmarkierung zu 20, 40 oder 60 Sekunden erfolgte nach 10 Minuten Chloramphenicoleinwirkung bzw. nach 20 Minuten Puromycineinwirkung.

3. Hemmung der Proteinsynthese durch Chloramphenicol, Streptomycin und Puromycin

Wenn die Translation für eine optimale Synthese von Lac-mRNA notwendig ist, sollte mit zunehmender Hemmung der Proteinsynthese eine entsprechende Abnahme an Lac-mRNA zu finden sein. Es war deshalb von Interesse zu erfahren, wie stark die Proteinsynthese unter den experimentellen Bedingungen der RNA-Pulsmarkierungsversuche (D 2.2. - 2.4) gehemmt war.

Wie der Tab. 4 zu entnehmen ist, kann die Proteinsynthese, gemessen als Leucineinbau in den Leucin-auxotrophen Stamm D53, weder durch Chloramphenicol oder Streptomycin, noch durch Puromycin vollständig gehemmt werden.

	Kontr.	Chloramphenicol			Streptomycin			Puromycin		
Antibiot. (µg/ml)	-	35	100	150	200	100	150	200	200	400	800
^{3}H-Leucin Einbau (%)	100	21.5	15.9	13.8	14.0	48.0	46.2	45.8	55.1	38.6	33.4

Tab. 4: Gleiche Volumina einer Bakterienkultur (D53) erhielten bei 2 x 10^8 Zellen/ml IPTG (1 mM) und cAMP (7 mM), nach 10 Minuten Chloramphenicol bzw. Puromycin in den angegebenen Konzentrationen. Streptomycin wurde entsprechend zu exponentiellen Zellen des Stammes D61 gegeben. ^{3}H-Leucin-Einbau (5 Minuten, 30°C) erfolgte nach jeweils 10 Minuten Chloramphenicol-, 15 Minuten Streptomycin- und 20 Minuten Puromycineinwirkung. Die Kontrollen erhielten kein Antibiotikum. Synthesestop und Messung der Radioaktivität sind im methodischen Teil beschrieben.

Chloramphenicolkonzentrationen >100 µg/ml hemmen den Leucineinbau um 86%, gleiche Streptomycinkonzentrationen um 54%. Puromycin erzielt erst bei einer Konzentration von 800 µg/ml eine 67%ige Hemmung.

In den in vivo-Pulsmarkierungsexperimenten (Abb. 5, 8 und 9) ergab Chloramphenicol (100 µg/ml)die niedrigsten, Streptomycin (100 µg/ml) etwas höhere und Puromycin (250 µg/ml) die höchsten Werte an Lac-mRNA. Unter Berücksichtigung der verwendeten Antibiotikakonzentrationen zeigte somit in diesen Experimenten Chloramphenicol die stärkste, Streptomycin eine mittlere und Puromycin die schwächste Hemmung der Proteinsynthese. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist, daß die Hemmung von Translationsstarts, wie sie in Gegenwart von Streptomycin und Chloramphenicol (siehe B 2.1.) beobachtet wird, auch zur Hemmung von Transkriptionsstarts am Lac-Promoter oder zu einem Stop der RNA-Kettenverlängerung führt.

Da Lac-mRNA mit 5.500 Nukleotiden ein überdurchschnittlich langer Messenger ist, soll in einem der folgenden Abschnitte untersucht werden, ob unter dem Einfluß der Antibiotika noch

hochmolekulare Lac-mRNA synthetisiert wird.

Im folgenden wird untersucht, ob die gesamte RNA-Synthese in E.coli ähnlich wie die Synthese von Lac-mRNA durch Blockierung der Proteinsynthese mit Antibiotikum gehemmt werden kann.

4. Einfluß von Streptomycin, Chloramphenicol und Puromycin auf die gesamte RNA-Synthese

4.1. Einfluß der Antibiotika auf die Gesamt-mRNA-Synthese

rRNA und tRNA werden nur von einem sehr kleinen Genomteil (etwa 0.4%) codiert, obgleich sie nahezu die gesamte zelluläre RNA darstellen (71, 72, 73). mRNA macht wegen ihrer Labilität (Halbwertszeit: ∿2 Min. bei 37°C) nur einen kleinen Teil (2-3%) der gesamten RNA-Masse aus, wird aber wegen der großen Zahl verschiedener mRNA's von einem großen Teil des Genoms codiert. Pulsmarkierte RNA besteht zu etwa 1/3 aus mRNA und zu 2/3 aus "precursor"-Molekülen stabiler RNA (rRNA und tRNA). Kennell (74) wies nach, daß nur etwa 10% der DNA zu über 99% mRNA (pulsmarkierte mRNA und langzeitmarkierte mRNA) komplementär sind. Viele E.coli-Gene sind folglich unter den Versuchsbedingungen inaktiv.

Bei Hybridisierung von pulsmarkierter RNA mit E.coli DNA hängt es somit neben den Konzentrationen der Reaktionspartner vom DNA:RNA-Verhältnis ab, ob und welche RNA-Spezies sättigend hybridisieren können. Wählt man das DNA:RNA-Verhältnis so klein, daß nur wenig ribosomale RNA gebunden werden kann, wird bevorzugt mRNA hybridisieren.

In der Abb. 10 wird die Hybridisierung von RNA (zu verschiedenen Zeiten in Gegenwart von Antibiotikum pulsmarkiert)

mit einem 4fachen E.coli DNA-Überschuß (D8) gezeigt. Die Kontrolle ohne Antibiotikum hybridisiert zu 36%. Chloramphenicol und Streptomycin reduzieren die Menge an hybridisierbarer RNA nach 15 bis 20 Minuten Inkubation um etwa 30%, Puromycin in der gleichen Zeit um 2o%.

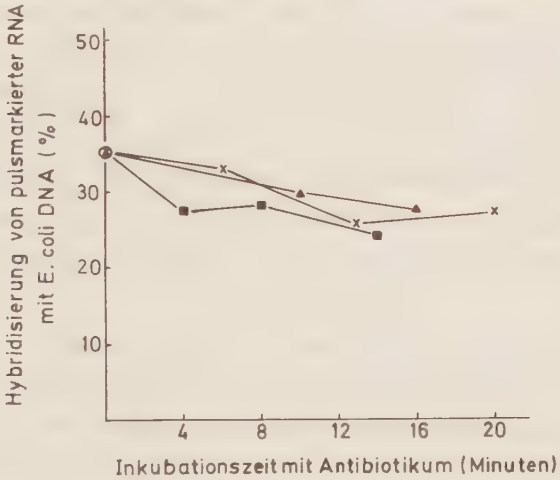


Abb. 10: Einfluß von Streptomycin, Chloramphenicol und Puromycin auf die Gesamt-mRNA-Synthese in E.coli. Gleiche Volumina einer Kultur des Stammes D61 erhielten in Gegenwart von cAMP (5 mM) gleichzeitig Streptomycin (100 µg/ml) -+-, Chloramphenicol (100 µg/ml)-■-, oder Puromycin (250 µg/ml) -▲-. Die Kontrollen erhielten kein Antibiotikum. Pulsmarkierung, 30 Sekunden bei 30°C, erfolgte zu den eingezeichneten Zeiten. Je 5 µg RNA wurden mit 20 µg DNA (auf Filter) in 0.6 ml 2xSSC, 50% Formamid, 48 h bei 55°C hybridisiert.

Unmarkierte ribosomale RNA kompetiert mit der markierten RNA bei der Hybridisierung um <10% (nicht dargestellt).

Diese Reduktion der Gesamt-mRNA-Synthese um 20-30% in Gegenwart der Antibiotika ist wesentlich kleiner als die beschriebene Abnahme an Lac-mRNA unter gleichen Bedingungen.

4.2. Einfluß der Antibiotika auf die ribosomale RNA-Synthese

RNA, die nach 10 Minuten Chloramphenicol- bzw. nach 20 Minuten Puromycineinwirkung - wie in Abb. 11a skizziert - pulsmarkiert worden ist, hybridisiert ebenso wie die Kontrolle ohne Antibiotikum mit einem 200fachen DNA-Überschuß zu 47%. Der höhere Hybridisierungswert läßt sich bei diesem RNA:DNA-Verhältnis auf eine bevorzugte Hybridisierung ribosomaler RNA-Sequenzen zurückführen, da die ribosomale RNA in etwa vergleichbaren Konzentrationen zur entsprechenden komplementären DNA vorliegt.

Durch Kompetitionshybridisierung mit kalter ribosomaler RNA ist es möglich, den Einfluß der Antibiotika auf die ribosomale RNA-Synthese zu untersuchen. Dies ist in der Abb. 11b dargestellt.

Die Hybridisierung ohne unmarkierte RNA betrug 47% und wurde auf 100% normiert. 39% der hybridisierten RNA des Kontrollversuchs ohne Antibiotikum, 61% der hybridisierten RNA aus Chloramphenicol-behandelten Zellen und 53% der hybridisierten RNA aus Puromycin-behandelten Zellen können von der DNA verdrängt werden, sind also rRNA.

Ein Block der Proteinsynthese durch Chloramphenicol, Streptomycin oder Puromycin hatte die spezifischen Aktivitäten der gesamten pulsmarkierten RNA nicht merkbar verändert. Der Grund für den unterschiedlichen Kompetitionsgrad müßte somit in einer 10-20%igen Stimulierung der rRNA-Synthese bei Inkubation von Zellen mit Puromycin bzw. Chloramphenicol zu suchen sein. Kürzlich wies Imamoto (41) ebenfalls eine verstärkte ribosomale RNA-Synthese in Gegenwart einer Reihe proteinsynthesehemmender Antibiotika nach.

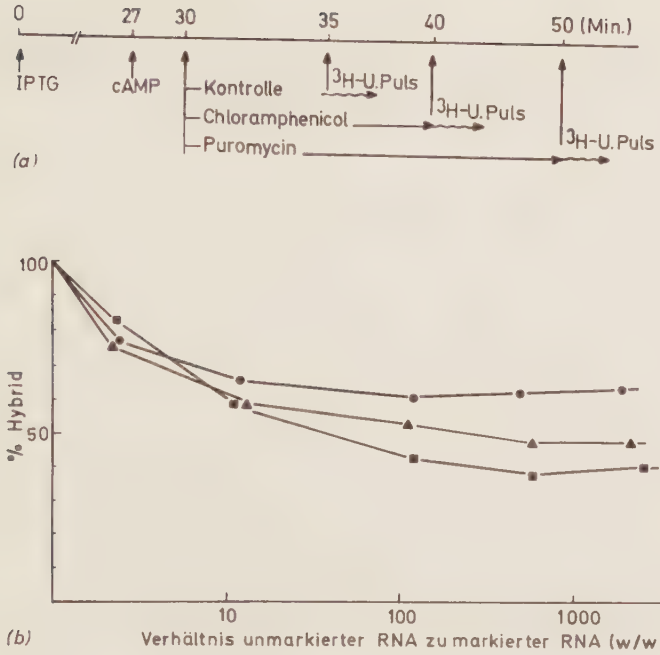


Abb. 11: Hybridisierung pulsmarkierter RNA mit E.coli DNA (D8) in Gegenwart kompetitierender ribosomaler RNA.
a) Gleiche Volumina einer exponentiellen Kultur des Stammes D53 erhielten 30 Minuten nach IPTG-Zugabe (1 mM) Chloramphenicol (150 µg/ml) oder Puromycin (250 µg/ml), 3 Minuten vor Antibiotikumzugabe cAMP (7 mM). Pulsmarkierung (10 µCi/ml), 30 Sekunden bei 30°C, erfolgte nach 10 Minuten Chloramphenicoleinwirkung bzw. nach 20 Minuten Puromycineinwirkung. Die Kontrolle ohne Antibiotikum wurde 25 Minuten nach IPTG-Zugabe in Gegenwart von cAMP pulsmarkiert. Spezifische Aktivität der pulsmarkierten RNA: ^{3}H-RNA der Kontrolle (-●-) 4,820 cpm/ µg, ^{3}H-RNA der Chloramphenicol-behandelten Zellen (-■-) 4,470 cpm/µg, ^{3}H-RNA der Puromycin-behandelten Zellen (-▲-) 4,530 cpm/µg.

b) Je 0.1 µg ^{3}H-RNA wurden mit einem 200fachen E.coli DNA-Überschuß (auf Filter) in Gegenwart steigender Mengen unmarkierter ribosomaler RNA (0.2 - 300 µg) in 0.6 ml 2xSSC, 50% Formamid, 48 h bei 55°C hybridisiert. Die Hybridisierung ohne unmarkierte RNA betrug 47% und wurde auf 100% normiert.

4.3. Bestimmung des stabilen RNA-Anteils

In der Abb. 12 ist der zeitliche Verlauf der RNA-Synthese nach gleichzeitiger Zugabe von ^{3}H-Uridin, Rifampicin und Nalidixinsäure dargestellt. Die Zellen waren zuvor mit IPTG induziert und mit Chloramphenicol oder Puromycin inkubiert worden. Rifampicin verhindert die Initiation der RNA-Synthese, Nalidixinsäure den Einbau von ^{3}H-markierten Vorstufen in die DNA. Da mRNA sehr viel rascher als ribosomale RNA abgebaut wird, gestattet diese Methode (75), den ribosomalen RNA-Anteil in einer heterogenen RNA-Population zu bestimmen.

Etwa drei Minuten nach Rifampicinzugabe sind Synthese und Abbau der RNA im Gleichgewicht. 30% dieser synthetisierten RNA werden im Verlaufe weiterer 5 Minuten abgebaut. Die verbliebenen 70% werden über 20 Minuten lang nicht abgebaut und stellen die stabile RNA (rRNA und tRNA) dar.

Ein Einfluß von Chloramphenicol oder Puromycin auf das Verhältnis mRNA zu rRNA, wie bei kurzen Pulsmarkierungen gefunden, läßt sich mit dieser Methode nicht nachweisen.

Dieser Versuch zeit jedoch ebenso wie der vorangegangene, daß die gesamte RNA-Synthese (Gesamt-mRNA und rRNA) durch Antibiotika nicht in dem Maße beeinflußt werden, wie die Synthese von Lac-mRNA.

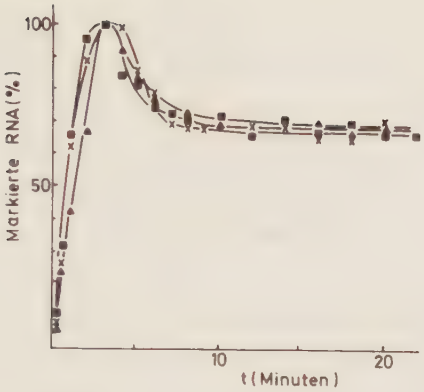


Abb. 12: Bestimmung des Anteils stabiler RNA (rRNA und tRNA). Gleiche Volumina einer Bakterienkultur (A19-15) erhielten 15 Minuten nach IPTG-Induktion in Gegenwart von cAMP (7 mM) Chloramphenicol (100 µg/ml) -■- oder Puromycin (250 µg/ml)-▲-. 10 Minuten nach Chloramphenicol- und 20 Minuten nach Puromycinzugabe wurden gleichzeitig ^{3}H-Uridin, Rifampicin und Nalidixinsäure zugegeben und zu den angegebenen Zeiten die markierte RNA durch TCA-Fällung bestimmt (siehe Methoden D 2.7). Kontrolle: ohne Chloramphenicol bzw. Puromycin -x-.

5. Sedimentationsverhalten von pulsmarkierter RNA aus Antibiotika-behandelten Zellen

Der Mechanismus des mRNA-Abbaus in E.coli ist weitgehend unverstanden. Sicher sind an diesem Prozess mehrere Endo- und Exonukleasen beteiligt, eindeutige Beweise stehen jedoch noch immer aus. Da mRNA in vivo wahrscheinlich nur polysomal vorkommt (76, 77) ist nicht ausgeschlossen, daß bestimmte Typen von Ribosomen RNasen enthalten. Mangiarotti und Turco (78) konnten kürzlich RNAse-Aktivität in Polyribosomen nachweisen.

Auf Grund von Untersuchungen, die vor allem am Trp- und Lac-Operon durchgeführt wurden, ergibt sich heute folgendes

Bild vom mRNA-Abbau:

1) Die Richtung des Abbaus durch Endo- und Exonukleasen verläuft vom 5' zum 3'-Ende (79,80).
2) Der Abbau erfolgt exponentiell und willkürlich (random): ein neusynthetisiertes mRNA-Molekül hat die gleiche Chance abgebaut zu werden wie ein altes (81,82).
3) Die Halbwertszeiten verschiedener mRNA's können sich erheblich unterscheiden (83).

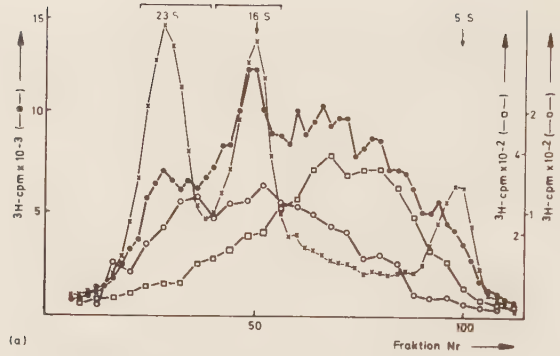
Verschiedene Halbwertszeiten gelten auch für Abschnitte innerhalb einer polycistronischen mRNA (84,85). Überraschend war dabei der Befund, daß die Lage eines solchen Abschnitts in der polycistronischen mRNA, nicht aber seine Länge entscheidend für seine Halbwertszeit ist: Im Trp-Operon mit den Strukturgenen E D C B A wird die operatorproximale E-Gen-mRNA (~1700 Nukleotide) bei 30°C in ~60 Sekunden, der operatordistale BA-Bereich (~2000 Nukleotide) in 95-115 Sekunden zur Hälfte abgebaut. Rückt dagegen durch eine Deletion der BA-Abschnitt in die Nähe des Operators, so wird die Halbwertszeit der BA-mRNA auf 60 Sekunden reduziert (85).
Im Lactose-Operon liegt die Halbwertszeit bei 30°C für die z-Gen-mRNA (3700 Nukleotide) bei 70-100 Sekunden (stammabhängig), für die a-Gen-mRNA (900 Nukleotide) bei 40-50 Sekunden. Im Gegensatz zur Trp-mRNA verlängert hier eine Verschiebung des a-Gens in den operatorproximalen Teil mittels einer Deletion die Halbwertszeit der a-mRNA auf ca. 200 Sekunden (84).
Man weiß heute noch nicht, welche Gründe für ein solches

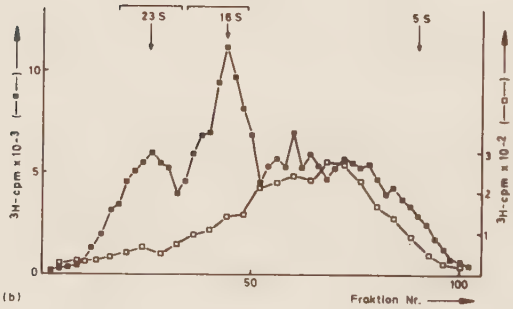
Verhalten ausschlaggebend sind. Denkbare Möglichkeiten sind z.B. unterschiedliche Konformationen der mRNA oder die Bindung von RNA-Abschnitten an die Membran, was vielleicht die Bindung von Ribosomen an die mRNA beeinflussen könnte. Wahrscheinlich wird RNA, die in Gegenwart proteinsynthesehemmender Antibiotika synthetisiert wird, ebenfalls von 5' nach 3' abgebaut (random degradation). Wird die RNA-Synthese nicht vorzeitig unterbrochen, sollte sich das Sedimentationsverhalten dieser RNA im Sucrose-Gradienten nicht ändern. Ebenso sollte ein Block der Transkription am ersten Translationsstartsignal das Sedimentationsmuster nicht wesentlich verändern, sondern nur die Höhe des Peaks reduzieren.

Im folgenden wird die Sedimentation von RNA aus Lac-induzierten Zellen, die in Gegenwart von cAMP pulsmarkiert worden waren, in SDS-Sucrose-Gradienten untersucht. Die Abb. 13a zeigt das Kontrollexperiment ohne Antibiotikum. In 13b und c werden die Sedimentationsprofile von RNA wiedergegeben, die nach 10 Minuten Chloramphenicol- bzw. nach 20 Minuten Puromycineinwirkung pulsmarkiert worden waren.

Durch Hybridisierung einzelner Fraktionen mit einem geringen E.coli DNA-Überschuß kann die Gesamt-mRNA-Verteilung bestimmt werden, während die Hybridisierung von Fraktionen mit Lac-DNA Aufschluß über die Größenverhältnisse von Lac-mRNA gibt.

Ein Vergleich der 3 Abbildungen zeigt für die gesamte markierte RNA keinen signifikanten Unterschied im Sedimentationsverhalten. Ebenso ist das E.coli mRNA-Pattern mit einem MAximum


23 S
16 S
5 S
3H-cpm x 10-3 (—●—)
3H-cpm x10-2 (—○—)
3H-cpm x10-2 (—□—)
Fraktion Nr
(a)


23 S
16 S
5 S
3H-cpm x 10-3 (—●—)
3H-cpm x 10-2 (—□—)
Fraktion Nr.
(b)

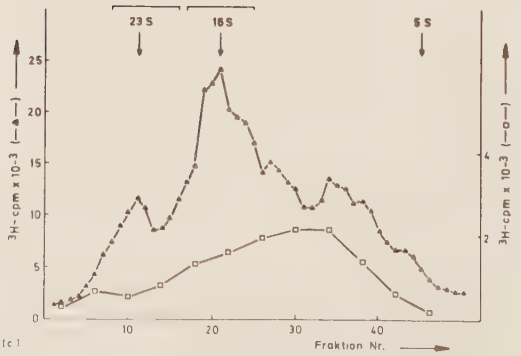

23 S
16 S
5 S
3H-cpm x 10-3 (—●—)
3H-cpm x 10-3 (—□—)
Fraktion Nr.
(c)

Abb. 13: Sedimentationsanalyse pulsmarkierter RNA in linearen SDS-Sucrosegradienten (5-20%).
Die Versuchsdurchführung zur Isolierung von RNA ist in der Abb. 11a beschrieben. Abweichend davon erhielten die Zellen (D53) 20 Minuten nach IPTG-Induktion zur Markierung ribosomaler RNA (-x- bzw. Pfeile) 25 µCi/ml ^{32}P und zur Pulsmarkierung 12.5 µCi/ml ^{3}H-Uridin. ^{3}H-RNA sedimentiert:
a) Kontrolle ohne Antibiotikum, 1.64 x 10^6cpm, 5.761 cpm/µg, -●-;
b) Chloramphenicol-Experiment, 1.78 x 10^6cpm, 5.435 cpm/µg, -■-;
c) Puromycin-Experiment, 1.27 x 10^6cpm, 4.806 cpm/µg, -▲-.
Die Hybridisierung der Gradientenfraktionen mit sättigender Menge Lac-DNA (-o-) bzw. mit E.coli-DNA (-□-) ist im methodischen Teil beschrieben. Die eingezeichneten cpm sind bezogen auf 100 µl Fraktionen. Die RNA in Abb. 13a und b wurde im SW 25 III Rotor (16 h, 24.000 rpm, 20°C), die RNA in Abb. c wurde im SW 41 Rotor (6,5 h, 41.000 rpm, 20°C) zentrifugiert.

bei etwa 10S in allen Gradienten annähernd gleich. Lac-mRNA läßt sich nur im Kontrollexperiment ohne Antibiotikum nachweisen. Hier wird ein Maximum an Lac-mRNA im 16-23S-Bereich gefunden. Diese S-Werte entsprechen einem Drittel bzw. zwei Dritteln der Länge eines Lac-mRNA Moleküls. Werden größere identische Bereiche aus je 2 Gradienten vereint und die daraus reisolierte RNA mit Lac-DNA hybridisiert, so läßt sich auch aus antibiotikabehandelten Zellen Lac-mRNA im 16-23S-Bereich nachweisen.

Da nach Sedat und Sinsheimer (86) Aggregation von Nukleinsäuren in SDS-Sucrose-Gradienten nicht ganz ausgeschlossen werden kann, wurde untersucht, ob sich das Verteilungsmuster von pulsmarkierter RNA verändert, wenn die Auftrennung in apolaren Lösungsmitteln erfolgt.

Abb. 14 zeigt Polyacrylamidgel-Elektrophoresen von pulsmarkierter RNA in Formamid. Ein Vergleich mit den SDS-Sucrose-Gradienten - es wurde die gleiche RNA eingesetzt - zeigte nur

im Bereich kleinerer RNA-Stücke (<16S) eine etwas bessere Auftrennung. Der Nachweis von höhermolekularer Lac-mRNA mittels SDS-Sucrose-Gradienten ist somit gerechtfertigt.

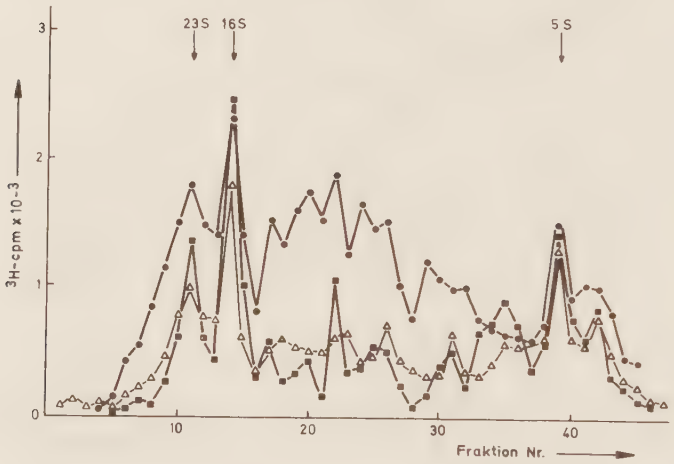


Abb. 14: Acrylamidgel-Elektrophorese von RNA in Formamid. Je 5 µl ^{3}H-RNA (15-20 µg) der gleichen pulsmarkierten RNA wie in Abb. 13 wurden in 4%igen Acrylamidgelen elektrophoretisiert (Bedingungen siehe Methoden D 2.9.).
Aufgetragene Radioaktivität:
Kontrolle ohne Antibiotikum 93,911 cpm, -●-;
Chloramphenicolexperiment 108,144 cpm, -■-;
Puromycinexperiment 92,950 cpm, -△-.

Die Sedimentation von pulsmarkierter RNA einer Lac-induzierten Bakterienkultur in 99%igem DMSO-Gradienten (Abb. 15) ergibt eine wesentlich schlechtere Auftrennung als in SDS-Sucrose-Gradienten. Hier wird für Lac-mRNA ein Maximum bei 16S gefunden. Obgleich DMSO die Aggregation von Nukleinsäuren vollkommen ausschließt, erweist sich

diese Methode aus technischen Gründen zur besseren Charakterisierung von RNA als ungeeignet. Es sei noch darauf hingewiesen, daß Scherrer et al. (87) kürzlich das Entstehen von Brüchen in Nukleinsäuren bei Behandlung mit DMSO beobachtete.

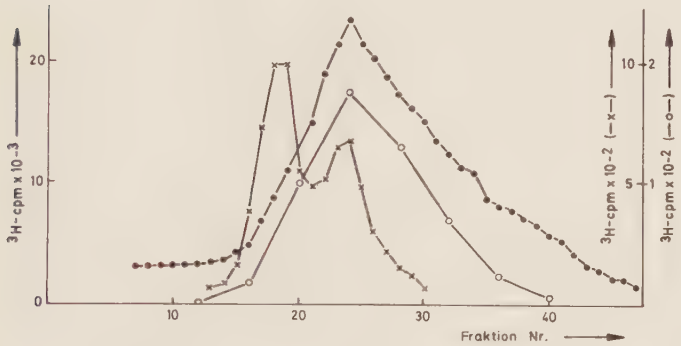


Abb. 15: Sedimentationsverhalten von ^{3}H-RNA in 99%igem DMSO-Gradienten. 20µl pulsmarkierte ^{3}H-RNA (277,247 cpm, -●-) einer Lac-induzierten Kultur (D70) wurden mit 5µl ^{14}C-rRNA (6,978 cpm, -x-) auf einen linearen 5 ml DMSO-Gradienten (siehe Methoden D 2.9.) aufgetragen und 14 h im SW 50.1 Rotor bei 50,000 rpm und 27°C zentrifugiert. 100 µl ^{3}H-RNA aus je vier gepoolten Fraktionen wurden zum Nachweis von Lac-mRNA (-o-) mit Lac-DNA hybridisiert.

Die Hybridisierung von RNA aus den in den Abb. 13a, b und c mit Klammern versehenen Abschnitten (16S-Bereich bzw. 23S-Bereich) mit Lac-DNA ist in der Tabelle 5 wiedergegeben.

	23 S - Bereich			16 S - Bereich			
	Eingesetzte ^{3}H-RNA (cpm·10^3)	cpm ^{3}H-RNA hybridisiert	% eingesetzte ^{3}H-RNA hybridisiert mit Lac-DNA	Eingesetzte ^{3}H-RNA (cpm·10^3)	cpm·^{3}H-RNA hybridisiert	% eingesetzte ^{3}H-RNA hybridisiert mit Lac-DNA	cpm ^{3}H-RNA hybrid. 16-s-B / cpm ^{3}H-RNA hybrid. 23-s-B
Kontrolle	19.5	162	0.84	36.7	254	0.69	1.54
Chloramphenicolexperiment	17.9	18	0.10	39.5	44	0.12	2.45
Puromycinexperiment	27.0	38	0.14	69.4	160	0.23	4.22

Tab. 5: Hybridisierung von ^{3}H-RNA nach Reisolierung aus SDS-Sucrose-Gradienten mit Lac-DNA (λplac1 -λcI857l-Strang DNA). Die Durchführung der Experimente ist im methodischen Teil. bzw. in den Legenden zu den Abb. 11a und 13a, b und c beschrieben worden. Aus je zwei Gradienten wurden folgende Fraktionen vereint:

23S-Bereich: Abb. 13a (22-39); Abb. 13b (18-33); Abb. 13c (8-16)

16S-Bereich: Abb. 13a (40-57); Abb. 13b (34-49); Abb. 13c (17-25)

Anhand der cpm der hybridisierten ^{3}H-RNA (2. und 5. Spalte) kann der Tabelle 5 entnommen werden, daß sowohl bei der Kontrolle als auch im Chloramphenicol- und Puromycinexperiment die Menge an Lac-mRNA im 16S-Bereich größer war als im 23S-Bereich.

Der Quotient $\frac{\text{cpm } ^{3}\text{H-RNA hybrid. 16S-Bereich}}{\text{cpm } ^{3}\text{H-RNA hybrid. 23S-Bereich}}$ zeigt dabei eine etwa 2-3fache Zunahme an Lac-mRNA im 16S-Bereich des Gradienten 13b (Chloramphenicolexperiment) bzw. des Gradienten 13c (Puromycinexperiment). Die Spalten 3 und 6 der Tabelle 5 zeigen die Reduktion an hybridisierender Lac-mRNA im 16-23S-Bereich der Gradienten. Die Abnahme an Lac-mRNA in diesem Bereich der Gradienten (13b und c) gegenüber dem Kontrollexperiment (13a) liegt etwa in der gleichen Größenordnung wie bei Hybridisierung der RNA vor Zentrifugation.

Diese Befunde zeigen, daß auch in Gegenwart von Chloramphenicol oder Puromycin noch relativ hochmolekulare Lac-mRNA synthetisiert wird. Die 2-3fache Zunahme an Lac-mRNA im 16S-Bereich der Gradienten spricht für ein neu eingestelltes Gleichgewicht zwischen Initiationen von RNA-Ketten am Lac-Promoter und einem etwas rascherem "random" Abbau in Gegenwart der Antibiotika. Da es nicht möglich war, eine Zunahme an Lac-mRNA aus antibiotikabehandelten Zellen im Bereich sehr kleiner Stücke zu finden - dies wurde nicht dargestellt - , ist der Abbaumechanismus vermutlich identisch mit dem normalen Lac-mRNA-Abbau. Obgleich sich durch Antibiotika hervorgerufene direkte Transkriptionsstops nicht nachweisen ließen, können diese, da in den beschriebenen Experimenten eine vollkommene Proteinsynthesehemmung nicht möglich war, nicht ausgeschlossen werden.

6. RNA-Synthese in einem in vitro-System

Bonhoeffer und Mitarbeiter (48) haben zur Untersuchung der DNA-Replikation in E.coli ein in vitro-System entwickelt. Dabei werden Bakterien auf einer Cellophanfolie ausgestrichen, durch osmotischen Schock lysiert und mit der Folie auf einen Tropfen Einbaugemisch (siehe D. 1.3.) gelegt, der markierte Vorstufen für die DNA- oder RNA-Synthese enthält. Während DNA- und RNA-Synthese nahezu unter in vivo Bedingungen ablaufen, findet im Zellysat keine nachweisbare Proteinsynthese statt (Tab. 6).

Inkubationszeit (Minuten)	0	5	10	15	20
TCA-fällbare ^{3}H-cpm	614	576	595	592	450

Tab. 6: Inkubation lysierter Zellen (D53) mit ^{3}H-Leucin. Cellophanfolien (Ø 12 mm) mit je 10^7 lysierten Zellen wurden auf je 30 µl in vitro-Einbaugemisch (+ 90 µCi/ml ^{3}H-Leucin, 46.9 Ci/mM) gelegt und bei 32°C inkubiert. Beendigung der Inkubation erfolgte mit eiskalter 6%iger TCA und 200 µg Leu/ml.

In der Tabelle 7 sind die spezifischen Aktivitäten von RNA's wiedergegeben, die im in vitro-System in 1,5 und 10 Minuten synthetisiert worden sind. Die Durchführung des Experiments ist im methodischen Teil (D 2.2) beschrieben. Wie der Tab. 7 zu entnehmen ist, zeigen 100 µg/ml Chloramphenicol in TM-Platten und Einbaugemisch keinen Einfluß auf die Markierung der gesamten RNA.

RNA-Synthesezeit (Minuten)	Spezifische Aktivität (^{3}H-cpm/µg RNA)	
	- Chloramphenicol	+ Chloramphenicol
1	115	143
5	747	693
10	1194	1183

Tab. 7: Spezifische Aktivität der in vitro synthetisierten RNA. Je 10^8 lysierte Zellen (D53), auf Cellophanfolien (Ø 24 mm) ausgestrichen, wurden bei 32°C auf 100 µl Einbautropfen (250 µCi/ml ^{3}H-UTP, 22 Ci/mM; ± 100 µg/ml Chloramphenicol) gelegt. Synthesestop erfolgte nach 1,5 bzw. 10 Minuten mit kaltem azidhaltigem Puffer.

6.1. Hybridisierung von ^{3}H-RNA mit E.coli DNA

Etwa 5 µg der in Tabelle 7 aufgeführten ^{3}H-RNA hybridisieren mit einem 4fachen E.coli DNA-Überschuß (D8) zu je 22% (Tab. 8). Kompetitierende ribosomale RNA im Hybridisierungsansatz senkt diesen Wert auf ca. 15%. RNA, die in Gegenwart von Chloramphenicol markiert worden war, ergibt entsprechende Werte. In vivo pulsmarkierte RNA hybridisiert in Gegenwart kompetitierender ribosomaler RNA unter gleichen Bedingungen zu etwa 30%. Es ist anzunehmen, daß die niedrigeren Hybridisierungswerte der in vitro synthetisierten RNA zum Teil auf langsamere Transkription, zum Teil auf die längeren Markierungszeiten zurückzuführen sind. Die Hybridisierung zeigt aber, daß eine beträchtliche Synthese von mRNA im in vitro-System stattfindet.

	RNA-Synthese-zeit (Minuten)	Eingesetzte ^{3}H-RNA (cpm)	% eingesetzte ^{3}H-RNA hybridisiert mit E.coli DNA	
			- rib. RNA	+ rib. RNA
Kontroll-experiment	1	645	21.5	14.1
	5	4410	22.7	16.0
Chloramph.-experiment	1	788	22.8	15.7
	5	4023	21.7	14.2

Tab. 8: Hybridisierung von in vitro synthetisierter RNA (∿5 µg) mit einem 4fachen E.coli DNA-Überschuß (DNA auf Filter). Bei den Kompetitionshybridisierungen wurde ein 35facher Überschuß ribosomaler RNA zugegeben. Hybridisierungsbedingungen: 0.6 ml, 50% Formamid, 2xSSC, 48 h bei 55°C.

6.2. Hybridisierung von ^{3}H-RNA mit Lac-DNA

Pulsmarkierung mit ^{3}H-UTP (1 Minute, 32°C) ergibt in vitro zu wenig hochmarkierte RNA, um sie mit Lac-DNA hybridisieren zu können. Da in in vivo-Experimenten nach IPTG-Induktion bei RNA-Markierungszeiten von 5, 10 und 20 Minuten der Nachweis von Lac-mRNA noch relativ gut möglich ist (Tab. 1), wurde für das in vitro-System eine Synthesezeit von 5 Minuten gewählt. In der Tab. 9 ist die Hybridisierung von Lac-DNA mit in vitro synthetisierter RNA wiedergegeben.

Wie der Tabelle 9 entnommen werden kann, entsprechen alle Hybridisierungswerte (Fehler $\pm$ 0.01%) dem "Nullwert" an "Lac-mRNA", der in vivo ohne IPTG-Induktion gefunden wird. Lac-mRNA-Synthese findet somit im in vitro-System nicht statt. Durch das Experiment mit der UV5-Mutante (D62) kann ausgeschlossen werden, daß das cAMP-bindende Protein (CAP) in diesem System limitierender Faktor für die Lac-mRNA-Synthese war. Wie bereits erwähnt, benötigt der Stamm D62 für die Lac-mRNA-Synthese keinen CAP-Faktor und somit auch kein cAMP.

Stamm	IPTG (1 mM)	cAMP (5 mM)	Eingesetzte ^{3}H-RNA (cpm · 10^3)	% eingesetzte ^{3}H-RNA hybridisiert mit Lac-DNA
D53	+	+	35.9	0.07
	-	-	47.8	0.03
D61	+	+	35.6	0.02
	-	-	49.4	0.01
D62 (UV5)	+	-	46.5	0.04
	-	-	31.2	0.04

Tab. 9: Hybridisierung von in vitro synthetisierter RNA mit Lac-DNA. Je 10^8 lysierte Zellen pro Cellophanfolie (Ø 24 mm) wurden 5 Minuten mit 100 µl Einbaugemisch (400 µCi ^{3}H-UTP/ml, 52 Ci/mM) bei 32°C inkubiert, Synthesestop, Isolierung und Hybridisierung der ^{3}H-markierten RNA mit λplacl- und λcl-DNA erfolgten wie üblich.

Auch die Möglichkeit, daß der Lac-mRNA-Nachweis im in vitro-System durch erhöhte Nukleaseaktivität beeinflußt wird, konnte ausgeschlossen werden. Dazu wurde ^{3}H-RNA aus Zellen (D53) isoliert, die in vivo nach Lac-Induktion pulsmarkiert worden waren. Diese RNA wurde auf Cellophanfolien mit lysierten Zellen des Stammes D61 (Lyse durch Inkubation auf PSM- und TM-Platten) gemischt und 0,5, 10 und 15 Minuten lang unter Synthesebedingungen des in vitro-Systems inkubiert. Die markierte RNA wurde nach der Phenolmethode reisoliert (80% Ausbeute) und mit Lac-DNA hybridisiert.

Aus der Tab. 10 ist zu ersehen, daß der Lac-mRNA-Anteil durch das Reisolierungsverfahren zwar stark gesenkt wird , der Hybridisierungswert von 0.32% jedoch 10 Minuten lang konstant bleibt.

Es ist nicht bekannt, warum die Proteinsynthese im in vitro-System nach Inkubation der Zellen auf PSM- und TM-Platten defekt ist. Da ein reduzierender Einfluß von Chloramphenicol auf die gesamte mRNA-Synthese nicht gefunden wird, ist anzunehmen, daß

Inkubationszeit (Minuten)	Eingesetzte ^{3}H-RNA nach Reisolierung (cpm · 10^3)	% eingesetzte ^{3}H-RNA hybridisiert mit Lac-DNA
0	115.1	0.32
5	125.5	0.35
10	109.3	0.32
15	100.9	0.14

Tab. 10: Hybridisierung von in vivo pulsmarkierter RNA (D53) mit Lac-DNA (λplacl - λcl) nach Inkubation im in vitro-System. Vor Inkubation hybridisierte die ^{3}H-RNA mit Lac-DNA zu 0.72%.

die Ribosomen im in vitro-System entweder sehr stark reduziert oder so defekt sind, daß eine Bindung von Antibiotikum an sie gar nicht mehr möglich ist.

Die Hybridisierung der markierten RNA mit E.coli DNA zeigt, daß im in vitro-System mRNA-Synthese, wenn auch reduziert, in Abwesenheit von Proteinsynthese stattfindet.

Da in vivo mit zunehmender Hemmung der Proteinsynthese die Menge an synthetisierter Lac-mRNA abnimmt und im in vitro-System bei vollständigem Block der Proteinsynthese keine Lac-mRNA-Synthese mehr nachweisbar ist, könnte im Falle des Lac-Operons für eine effektive, den in vivo Verhältnissen nahekommende Transkription simultane Translation oder wenigstens der Translationsstart notwendig sein.

Die Frage, ob die Lac-Transkription noch initiiert wird und erst auf Grund des defekten Translationsstarts unterbrochen wird, kann nicht beantwortet werden. Ebenso bleibt die Frage unbeantwortet, warum nur bei verhältnismäßig wenigen Operons die Translation für eine effektive Transkription notwendig ist. Eine

endgültige Klärung dieser Frage wird erst möglich sein, wenn man über ein in vitro-System verfügt, in dem gleichzeitig Transkriptions- und Translationsprozesse kontrolliert werden können.

C. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Frage untersucht, ob für eine effektive Transkription der Lac-Gene von E.coli eine simultan ablaufende Translation notwendig ist, weiterhin ob die Verhältnisse im Lac-Operon auf die gesamte mRNA-Synthese in E.coli übertragen werden können.

In vivo wurden dazu Zellen in exponentieller Phase nach Block der Proteinsynthese durch Antibiotika mit ^{3}H-Uridin pulsmarkiert.

Der Anteil an neusynthetisierter Lac-mRNA wurde durch Hybridisierung mit Lac-DNA, die Synthese der gesamten mRNA durch Hybridisierung mit E.coli DNA bestimmt.

In einem den in vivo-Bedingungen sehr nahekommenden in vitro-System (lysierte Zellen) wurde untersucht, ob Lac-mRNA bei vollständigem Ausfall der Proteinsynthese noch synthetisiert werden kann.

Es konnte gezeigt werden, daß Chloramphenicol, Streptomycin und Puromycin in wachsenden Zellen die Lac-mRNA-Synthese auf 3-5% ihres ursprünglichen Wertes reduzieren, wobei Chloramphenicol und Streptomycin in 4 bzw. 10 Minuten, Puromycin bei 2-3fach höherer Konzentration erst nach etwa 20 Minuten diese Reduktion erreichen. Die niedrigsten Lac-mRNA-Werte wurden stets gefunden, wenn auch die Proteinsynthese am stärksten gehemmt war.

Exogenes cAMP hob in vivo die Lac-mRNA-Synthese in Gegenwart von Chloramphenicol und Streptomycin um 20-30% an, in Gegenwart von Puromycin um 40-60%. Dies zeigt, daß die Antibiotika sowohl

durch Biosynthese-Hemmung als auch durch Erhöhung des Katabolitniveaus die Transkriptionsstarts am Lac-Promoter hemmen (Katabolitrepression).

Die gesamte E.coli mRNA-Synthese wurde von Chloramphenicol und Streptomycin nur um etwa 30%, von Puromycin um etwa 20% reduziert. Die ribosomale RNA-Synthese stieg in Gegenwart der Antibiotika um 10-20% an. Die gesamte RNA-Synthese blieb gleich.

Untersuchungen über die Größenverteilung von in vivo puls-markierter RNA in SDS-Sucrose-Gradienten zeigten ein breites Maximum an Lac-mRNA im 16-23S-Bereich und ein Maximum für die gesamte E.coli mRNA im Größenbereich um 10S. Bei mit Antibiotika behandelten E.coli Zellen veränderte sich die Lage des Maximums der Gesamt-mRNA im Gradienten nicht. In Gegenwart von Antibiotikum synthetisierte Lac-mRNA ließ sich - stark reduziert - nur im 16-23S-Bereich der Gradienten nachweisen. Der prozentuale Anteil dieser Lac-mRNA nahm im Größenbereich um 16S gegenüber dem 23S-Bereich um den Faktor 2-3 zu. Dieser Befund spricht für einen etwas beschleunigten Abbau der in Gegenwart von Antibiotikum synthetisierten Lac-mRNA. Das Sedimentationsverhalten der RNA weist aber zugleich darauf hin, daß die Antibiotika die Kettenverlängerung der RNA, wenn überhaupt, nur wenig beeinflussen.

Es ist fraglich, ob ein beschleunigter Abbau neben der erwähnten Antibiotika-induzierten Katabolitrepression die eigentliche Ursache für die starke Lac-mRNA Reduktion ist. Wahrscheinlicher führt eine Hemmung von Translationsstarts, wie sie in Gegenwart von Chloramphenicol und Streptomycin beobachtet wird, in den in vivo-Experimenten auch zu Transkriptions-

stops in der Nähe des Translationsstartsignals. Diese Annahme erklärt besser, warum in Gegenwart von Chloramphenicol und Streptomycin stets nur eine geringe Lac-mRNA-Synthese nachweisbar ist.

Ebenso sprechen für die Notwendigkeit einer gleichzeitigen Translation Experimente in einem in vitro-System. Bei vollständigem Ausfall der Proteinsynthese ließ sich keine Lac-mRNA-Synthese nachweisen, während die gesamte E.coli mRNA-Synthese geringfügig gehemmt war. Chloramphenicol zeigte in diesem System keinen Einfluß auf die RNA-Synthese. Eine erhöhte Nukleaseaktivität konnte unter den Synthesebedingungen des Systems ausgeschlossen werden.

Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß das Lactose-Operon in E.coli zu jenen Operons gehört, die für eine effektive Transkription den intakten Translationsprozess bzw. intakte Translationsstarts benötigen, während der größere Teil der E.coli mRNA ohne gleichzeitige Translation optimal synthetisiert werden kann.

D. Material und Methoden

1. Material

1.1. Stämme

E.coli K12 Stämme	Genetische Merkmale	Erhalten von
D8	$F^-\nabla$(lac proA,B)$^-$ B_1^-	F. Jacob
D27	$F^-\nabla$(lac proA,B)$^-$ (λc_{I857}h80t68dlac$^+$)/ F'lac$^+$ proA,B$^+$	J. Beckwith
D28	$F^-\nabla$(lac proA,B)$^-$ (λc_{I857}h80t68dlac i$^+$ z$^-$ $_{U118}$y$^+$) / F'lac i$^+$ z$^+$ $_{U118}$y$^+$ proA,B$^+$	J. Miller
D31	$F^-\nabla$(lac proA,B) spc^R B_1^- str^S	R. Gestland
D48	Hfr met$^-$ λ^R RNase I$^-$	
D53	F^- thr$^-$ leu$^-$ lac$^+$ RNase I$^-$ pnp_{13}^- mal$^-$ xyl$^-$ mtl$^-$ str^R	
D55	F^- leu$^-$ lac$^-$ (z$^-$ $_{U118}$) $_{str^R}$ RNase I$^-$ pnp_{13}^- mal$^-$ xyl$^-$ mtl$^-$	aus D57
D57	F^- leu$^-$ lac$^+$ RNase I$^-$ pnp_{13}^- mal$^-$ xyl$^-$ mtl$^-$ str^R	W. Gilbert aus PR 13
D61(CA8000)	Hfr H B_1^- (λ^-) str^S lac$^+$	J. Beckwith
D62(UV5)	lac p Doppelmutante (Katabolitrepression-insensitiv) aus CA8000	J. Beckwith
D63	W3110 trpR$^-$ su$^-$	D. Morse
D64	W3110 trpR$^-$ su$^-$ suA	D. Morse
D65	$F^-\nabla$(lac pro)$^-$ str^R suA$^+$	J. Beckwith
D69	W3110 str^R	H. Strack
D70	W3110 thr$^-$ trpR$^-$ trpE 9851 (ochre, stark polar)	D. Morse
D71	W3110 thr$^-$ trpR$^-$ trpE 9851 suA$^+$	D. Morse
A 19-15	Hfr (λ)met$^-$ tyr$^-$ RNaseI$^-$	H. Jockusch

Phagen		
λplac 5	Plaque bildender transduzierender Phage mit lac poz und Teilen von i und y (49)	J. Beckwith
λc_{I857}	hitzeinduzierbarer Phage (88)	H. Strack
λc_I	klare Plaquemutante von λ (89)	H. Strack

1.2. Chemikalien

IPTG, Puromycin und RNase A wurden von Sigma, Chemical Comp., St. Louis, USA, bezogen. cAMP (Cyclisches Adenosin 3',5'-Monophosphat), Chloramphenicol, Lysozym, Poly UG (Poly Uridyl-Guanylsäure), Nukleosid-Triphosphate und Desoxytriphosphate waren Produkte von Boehringer Mannheim GmbH, Streptomycin und Baycovin (Diethylpyrocarbonat) waren von den Farbenfabriken Bayer, Leverkusen. Weiter gebraucht wurden DNase I (RNase-frei) von Worthington, Biochemic. Corp., New Jersey und Rifampicin und Sucrose ultrapur von Schwarz/Mann, Orangeburg, N.Y. Pronase, Puromycin, Penicillin, Na-Dodecylsulfat (SDS) und Spermidin G wurden von Serva, Feinbiochemika, Heidelberg bezogen, Nalidixinsäure von Winthrop Lab. Ltd.

Die radioaktiven Substanzen 5-^{3}H-Uridin (20-30 Ci/mM), 5-6^{3}H-Uridin (>40 Ci/mM), 5-^{3}H-UTP (22 Ci/mM), 5-6-^{3}H-UTP (52 Ci/mM) und ^{32}P-Orthophosphat (20 mCi/ml, 50-140 Ci/mg) wurden von The Radiochemical Center, Amersham, England, erhalten.

Nitrocellulosefilter Nr. 11303 (Ø 2,4 cm, Porengröße 0.15 µm) waren von Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen. Bio-Gel A-5m wurde von Bio-Rad, Richmond, Calif., USA, und Kalle-Einmachcellophanfolie (22 µm dick) von Kalle, Wiesbaden-Biebrich, erhalten.

1.3. Medien, Lösungen

TGlyC-Medium: 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, 7 mM NaCl, 10 mM NH_4Cl, 3 mM KH_2PO_4, 2 mM $MgSO_4$, 0.2 mM $CaCl_2$, 0.1 mg/l $FeCl_3$, 4 mg/l Vitamin B1, 0.2% vitaminfreie "Casaminosäuren" (Difco) und 0.5% Glycerin.

In vitro-Einbaugemisch: 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA, 0.1 M KCl, 20 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 0.17 mM dT und rU, 1 mM rATP, rGTP, rCTP und rUTP (^{3}H UTP: 250-400 µCi/ml, 22-52 Ci/mM), 1 mM Spermidin, ± 1 mM IPTG, ± 5 mM cAMP.

TM: 20 mM Tris-HCl, pH 7.8, 5 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA.

TM-Platten: 2% Bacto Agar (Difco) in TM.

PSM-Platten: 5 g NaCl, 8 g Nutrient Broth (Difco), 15 g Bacto Agar, 0.98 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 500.000 E Penicillin (erst nach dem Erhitzen zugegeben), 113 g Sucrose/Liter.

1xSSC: 0.15 M NaCl, 0.015 M NaCitrat.

Toluol-Szintillator: 5 g PPO (Diphenyloxazol) in 1 Liter Toluol.

Triton-Szintillator: 30 g PPO in 3 Liter Toluol + 1,5 Liter Triton X-100.

2. Methoden

2.1. Pulsmarkierung von RNA in vivo

Die Stämme wuchsen bei 37°C mit Belüftung in TGlyC Medium. Bei 2-3 x 10^8 Bakterien/ml wurde das Lac-Operon durch Zugabe von IPTG (1 mM) induziert.

Nach 3 Minuten Einwirkung von cAMP (7 mM) wurde zum Zeitpunkt t = 20 bzw. 30 Minuten Antibiotikum zugegeben.

Pulsmarkierung erfolgte zu verschiedenen Zeiten nach Antibiotikumzugabe mit ^{3}H-Uridin (20-30 Ci/mMol; Endkonzentration 4 µCi/ml) bei 32°C in aliquoten Teilen. Der Einbau wurde nach 30 Sekunden durch Ausgießen auf ein gleiches Volumen gefrorenen Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 200 µg/ml Chloramphenicol, 20 mM NaN_3) beendet. Die abzentrifugierten Zellen wurden in 2.5 ml 0.02 M Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA aufgenommen und

sofort in Co_2-Trockeneis-Äthanol-Mischung in Gegenwart von DNase I (30 µg/ml) und Lysozym (600 µg/ml) dreimal rasch eingefroren und aufgetaut. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt.

2.2. RNA-Synthese im in vitro-System

Die Bakterien wuchsen in TGlyC-Medium auf 2 x 10^8 Zellen/ml. Nach Konzentrierung auf 5 x 10^7 Zellen/ µl in gleichem Medium wurden je 2 µl auf Cellophanfolien (2.4 cm Ø), die auf vorgewärmten PSM-Platten lagen, gleichmäßig ausgetrichen und 2.5 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Cellophanfolien mit der Bakterienschicht nach oben auf TM-Platten transferiert und bei 4°C mindestens 10 Minuten belassen. Nach einmaligem Übertragen auf eine neue TM-Platte wurden die lysierten Zellen auf dem Filter vorsichtig mit einem Föhn getrocknet (2-5 Minuten).

Zur Synthese von ^{3}H-RNA wurden jeweils 0.1 ml Einbaugemisch (siehe D 1.3.) auf eine Parafilmfolie pipettiert, die zuvor auf eine Heizplatte mit 32°C gelegt worden war. Zur Zeit t = 0 wurde die Cellophanfolie mit dem Zellysat nach oben auf den Einbaugemischtropfen gelegt. Synthesestop erfolgte zu bestimmten Zeiten durch rasches Eintauchen der Cellophanfolien in kaltes azidhaltiges Medium (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 2 mM EDTA, 20 mM NaN_3). Die Isolierung der synthetisierten RNA wurde wie in den in vivo Experimenten durchgeführt. Um die Ausbeute zu erhöhen, wurde in einigen Experimenten bei der Alkohlfällung Hefe-RNA als Träger zugegeben.

2.3. Extraktion markierter RNA

Zu den Proben (D 2.1, 2.2.) wurden 2 ml 1 M Natriumacetat, pH 5.2, 0.1 ml Baycovin und 0.1 ml 20%iges SDS gegeben und nach 10 Minuten Schütteln bei Zimmertemperatur weitere 5 ml 1 M Natriumacetat und 7 ml mit 1 M Natriumacetat (pH 5.2) gesättigtes Phenol. Aus den vereinigten wässrigen Phasen aus zwei weiteren Phenolextraktionen und einer einmaligen Reextraktion der Phenolphasen wurde die RNA mit 2 1/2-fachem Volumen Äthanol 10 Stunden bei -20°C gefällt. In einigen Experimenten wurde die RNA in 0.1 M Natriumacetat, pH 5.2, aufgenommen und nach 4 Minuten bei 100°C durch eine doppelte Lage Nitrocellulosefilter abgesaugt. Der Hybridisierungsnullwert wurde durch die Hitzedenaturierung erheblich reduziert.

Nach einer weiteren Äthanolfällung wurde die RNA in 2xSSC gelöst und die Radioaktivität nach Fällung mit 6%iger TCA (Trichloressigsäure) bestimmt.

2.4. Isolierung ribosomaler RNA

Ribosomen des Stammes D48 wurden nach Revel (90) isoliert. Aus diesen wurde durch Phenolextraktion ribosomale RNA gewonnen. ^{14}C-markierte ribosomale RNA wurde mir von D. Dütting zur Verfügung gestellt.

2.5. Isolierung von E.coli DNA

Zellen des Stammes D8 wurden nach der Baycovin-SDS-Methode von Solymosy et al. (91) lysiert und teilweise deproteinisiert. Der zellfreie Überstand wurde mit gleichem Volumen Chloroform-n-Octanol (5:1) 1 h bei 25°C geschüttelt, die Fällung der

Nukleinsäuren erfolgte aus der wässrigen Oberphase mit 2 1/2-fachem Volumen Äthanol. Der Niederschlag wurde in 2xSSC gelöst und je 1 h mit pankreatischer RNase (20 µg/ml) bei 25°C und mit Pronase (50 µg/ml, in 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4, 2 h bei 37°C vorinkubiert) bei 37°C verdaut. Nach Wiederholung des Extraktionsverfahrens einschließlich der Solymosy-Methode wurde die DNA in 0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, gelöst und über eine Biogel-A5M-Säule, mit gleichem Puffer äquilibriert, geschickt. Nach Äthanolfällung des gepoolten Ausschlußpeaks und einstündiger Alkalibehandlung mit 0.5 N NaOH bei 25°C erfolgte nach Neutralisierung mit H_3PO_4 Dialyse gegen 0.1xSSC.

2.6. Hybridisierungstechnik

Die Isolierung von Einzelstrang-DNA aus den Phagen λplac 5, λcI und λcI857 wurde nach der Methode von Hradecnas und Szybalski (92) mit Poly-UG durchgeführt bei Verwendung der Alkalidenaturierung nach Shapiro et al. (49). Nach 21 h Alkalibehandlung mit 0.3 M KOH bei 37°C wurden die Einzelstränge zur Entfernung von abgebautem Poly-UG gegen 2xSSC dialysiert. Nach 4-stündiger Selbsthybridisierung bei 65°C in 2xSSC und langsamem Abkühlen wurde die Einzelstrang-DNA in gefrorenem Zustand aufbewahrt.

Zur Konzentrationsbestimmung galt nach Bishop (93) für Einzelstrang-DNA und -RNA: 24 OD_{260} = 1 mg/ml und für Doppelstrang-DNA: 20 OD_{260} = 1 mg/ml.

a) Hybridisierung mit Lac-DNA: Hybridisierungen von markierter RNA mit 2-5 µg λplac 1-, λc 1 - oder λcI857 1-DNA erfolgten in 0.2 ml 2xSSC, 2%igem Phenol, 4 h bei 65°C. Bis zur weiteren Aufarbeitung

wurden die Proben bei -80°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurden sie mit je 1 ml eiskaltem 6xSSC verdünnt und langsam durch Nitrocellulosemembranen filtriert, die vorher mindestens 30 Minuten in 5xSSC eingeweicht und mit 20 ml 5xSSC auf der Fritte vorgewaschen worden waren. Die beladenen Filter wurden mit 40 ml 5xSSC bei schwachem Vakuum gewaschen und in 5 ml 2xSSC mit hitzebehandelter pankreatischer RNase (20 µg/ml) 1 h bei Raumtemperatur geschüttelt. Beide Filterseiten wurden anschließend mit je 40 ml 5xSSC gewaschen und nach dem Trocknen in 5 ml Toluol-Scintillator im Packard Tricarb gezählt.

b) Bestimmung der Lac-mRNA: Es wurden konstante Mengen ^{3}H-RNA mit steigenden Konzentrationen an λplac 1-Strang- und λ1-Strang-DNA hybridisiert. Die Differenz aus den hybridisierten ^{3}H-cpm entsprach dem Lac-mRNA-Anteil. Dieser wurde in % hybridisierter ^{3}H-cpm der eingesetzten ^{3}H-cpm angegeben. Die Lac-Transkription bei mit Antibiotika behandelten Bakterien gegenüber der Kontrolle wurde bezeichnet als

"Relative Lac-Transkription"

$$= \frac{\%\text{ der eingesetzten cpm, die x min nach Antibiotikumzugabe hybridisierten} \times 100}{\%\text{ der eingesetzten cpm, die bei Fehlen von Antibiotikum hybridisierten}}$$

λc 1 und λcI857 1 hybridisierten in gleichem Maße.

c) Hybridisierung mit E.coli DNA (D8): E.coli DNA-Filter mit maximal 30 µg DNA/Filter wurden nach Landy (94) hergestellt. Kontrollfilter enthielten entweder keine DNA oder waren mit Kalbsthymus DNA beladen. Die Hybridisierung erfolgte in Packardgläschen in 0.6 ml Gesamtvolumen, 2xSSC, 50% Formamid,

48 h bei 55°C. Der Schmelzpunkt von E.coli DNA liegt in 50%igem Formamid und 2xSSC bei 67°C (95). Die Inkubationstemperatur von 55°C wurde so hoch festgesetzt, um unspezifische Hybridisierung auszuschließen.

2.7. Nachweis stabiler RNA (rRNA, tRNA)

Bakterien des Stammes A19-15 wuchsen bei 32°C mit Belüftung in TGlyC-Medium und wurden bei einem Zelltiter von ca. $2x10^8$ Zellen/ml mit IPTG induziert. 15 Minuten nach IPTG-Zugabe erhielten je 3 ml Portionen cAMP (7 mM) und entweder Chloramphenicol (100 µg/ml) oder Puromycin (250 µg/ml). Nach 10 Minuten Wachstum in Gegenwart von Chloramphenicol bzw. 20 Minuten in Gegenwart von Puromycin wurde eine Mischung aus ^{3}H-Uridin (3 µCi/ml), Rifampicin (250 µg/ml) und Nalidixinsäure (40 µg/ml) zugegeben und im Zeitraum von 20 Minuten 0.1 ml Zeitwerte in 95°C Lysispuffer (0.1 M NaCl, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.5, 0.02 M EDTA, 0.5% SDS) pipettiert. Die Kontrolle hatte kein Antibiotikum erhalten. Die Proben wurden nach 5 Minuten bei 95°C abgekühlt, filtriert, die Nitrocellulosefilter mit 0.01 M TCA gewaschen und nach dem Trocknen im Packard-Tricarb gezählt.

2.8. Einbau von ^{3}H-Leucin in Bakterien

Exponentielle Zellen der Stämme D53 und D61 wuchsen in TGlyC-Medium bei 30°C und erhielten 10 Minuten nach IPTG-Induktion (1 mM) in Gegenwart von cAMP (7 mM) CM (35, 100, 150, 200 µg/ml), SM (100, 150, 200 µg/ml) oder Puromycin (200, 400, 800 µg/ml). Nach 10 Minuten Chloramphenicol, 15 Minuten Streptomycin und 20 Minuten Puromycineinwirkung erfolgte jeweils 5 Minuten Einbau

von ^{3}H-Leu (20 µCi/ml; 46.9 Ci/mMol). Der Einbaustop erfolgte mit eiskalter 6%iger TCA, die L-Leucin (200 µg/ml) enthielt. Die Proben wurden 15 Minuten in einem kochenden Wasserbad erhitzt, der Niederschlag auf Milliporefilter (0.15 µ) gesammelt, gewaschen und nach dem Trocknen im Packard Tricarb gezählt.

2.9. Charakterisierung der Größenverteilung von RNA

a) SDS-Sucrose-Gradienten: 5 und 20% Sucrose in 0.04 M Tris-Acetat, pH 7.2, 0.02 M Natriumacetat, 0.001 M EDTA wurde mit Baycovin (0.6%) erhitzt, nach Zersetzung des Baycovins auf 0.4% SDS gebracht. 12 ml Gradienten wurden mit 100 µl ^{3}H-RNA-Lösung (ca. 250 µg), 17 ml Gradienten mit 150 µl ^{3}H-RNA-Lösung (ca. 300 µg) überschichtet.

Als Marker diente ^{14}C- oder ^{32}P-markierte ribosomale RNA. Nach Zentrifugation im SW 41 Rotor (6.5 h, 41.000 rpm, 20°C) bzw. im SW 25-III Rotor (16 h, 24.000 rpm, 20°C) wurden die Gradienten vom Boden her zu je 8 bzw. 16 Tropfen fraktioniert.

b) Gelelektrophorese von Nukleinsäuren in Formamid: Die Herstellung von 4%igen Polyacrylamidgelen (l = 90 mm, Ø = 5 mm) und die Durchführung der Elektrophorese in Formamid erfolgte nach Staynov et al. (96). Pro Gel wurden ca. 15 µg markierte RNA mit spezifischen Aktivitäten von 5-6000 cpm/µg aufgetragen. Die Laufzeit bei 3-4 mA/Gel betrug 3.5 h. Nach Zerkleinerung der Gele in 50 Fraktionen mit einer automatischen Gelschneidemaschine (Savant Inc.) wurde die RNA aus den Gelfraktionen 12 h bei 65°C mit 0.5 ml 6xSSC und einem Tropfen conc. NH_3 eluiert. Die Radioaktivität des Eluats wurde in 10 ml Triton-Scintillator im Packard Tricarb bestimmt.

c) DMSO-Gradienten: 5 ml lineare DMSO-Gradienten aus 99% d_6-DMSO, 10% w/v Sucrose, 1 mM EDTA, pH 7.0, und 10% d_6-DMSO, 90% DMSO, 1 mM EDTA, pH 7.0 wurden nach Sedat (86) hergestellt.

5 µl ^{14}C-markierte rRNA und 20 µl ^{3}H-RNA (1-2 OD_{260}-Einheiten) in 0.01 M Salz wurden nach Mischen mit 90 µl 99% DMSO und 10 µl Dimethylformamid aufgetragen und 14 h im SW 50.1 Rotor bei 50.000 rpm und 27°C zentrifugiert. Fraktionen à 8 Tropfen wurden mit 7 ml Triton-Scintillator versehen und gemessen.

d) Hybridisierung von RNA aus Gradientenfraktionen mit Lac-DNA und E.coli DNA: Je vier Fraktionen wurden gepoolt und davon jeweils 100 µl ^{3}H-RNA mit Lac-DNA (2-4 µg λplac 1-Strang-bzw. λc 1-Strang-DNA) bzw. mit E.coli DNA (20 µg auf Filter) hybridisiert. Weiter wurden aus je zwei gleichen Gradienten identische Fraktionen definierter 23S- und 16S-Bereiche (Abb. 13 mit Klammern versehen) vereint. Nach Fällung der RNA mit 2 1/2-fachen Volumen Äthanol wurde diese in 2xSSC aufgenommen und mit Lac-DNA (2-4 µg) hybridisiert. Hybridisierungbedingungen wie unter D 2.4.

E. Literatur

1. Jacob, F., Monod, J.: Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol. 3, 318-356 (1961).

2. Gilbert, W., Müller-Hill, B.: The lac operator is DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 58, 2415-2421 (1967).

3. Riggs, A.D., Bourgeois, S.: On the assay, isolation and characterization of the lac repressor. J. Mol. Biol. 34, 361-364 (1968).

4. Ohnishi, Y., Silengo, L., Kuwano, M., Schlessinger, D.: 3',5'-Cyclic adenosine monophosphate-requiring mutants of E.coli. J. Bacteriol. 111, 745-749 (1972).

5. Emmer, M., Crombrugghe B. de, Pastan, J., Perlman, R.: Cyclic AMP receptor protein of E.coli: its role in the synthesis of inducible enzymes. Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 480-487 (1970).

6. Riggs, A.D., Reiness, G., Zubay, G.: Purification and DNA-binding properties of the catabolite gene activator protein. Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1222-1225 (1971).

7. Beckwith, J., Grodzicker, T., Arditti, R.: Evidence for two sites in the lac promoter region. J. Mol. Biol. 69, 155-160 (1972).

8. Pastan, J., Perlman, R.: Cyclic adenosine monophosphate in Bacteria. Science 169, 339-344 (1970).

9. Pastan, J., Perlman, R.: Cyclic AMP in metabolism. Nature New Biology 229, 5-7, 32 (1971).

10. Perlman, R., Pastan, J.: Cyclic 3,5-AMP: Stimulation of ß-galactosidase and tryptophanase induction in E.coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 656-664 (1968).

11. Zubay, G., Schwartz, D., Beckwith, J.: Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: a positive control system. Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 104-110 (1970).

12. Eron, L., Arditti, R., Zubay, G., Connaway, S., Beckwith, J.: An adenosine 3':5'-cyclic monophosphate-binding protein that acts on the transcription process. Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 215-218 (1971).

13. Crombrugghe, B. de, Chen, B., Gottesman, M., Pastan, J., Varmus, H.E., Emmer, M., Perlman, R.L.: Regulation of lac mRNA synthesis in a soluble cell-free system. Nature New Biology 230, 37-40 (1971).

14. Crombrugghe, B. de, Chen, B., Anderson, W., Nissley, P., Gottesman, M., Pastan, J.: Lac DNA, RNA polymerase and cyclic AMP receptor protein, cyclic AMP, lac repressor and inducer are the essential elements for controlled lac transcription. Nature New Biology 231, 139-142 (1971).

15. Stent, G.S.: The operon: On its third anniversary. Science 144, 816-820 (1964).

16. Adesnik, M., Levinthal, C.: The synthesis and degradation of lactose operon messenger RNA in E.coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 451-459 (1970).

17. Eron, L., Block, R.: Mechanism of initiation and repression of in vitro transcription of the lac operon of E.coli. Proc. Nat. Acad. Sci. 68, 1828-1832 (1971).

18. Chen, B., Crombrugghe, B. de, Anderson, W.B., Gottesman, M.E., Pastan, J., Perlman, R.L.: On the mechanism of action of lac repressor. Nature New Biology 233, 67-70 (1971).

19. Rose, J.K. Squires, C.L., Yanofsky, Ch., Yang, H.L., Zubay, G.: Regulation of in vitro transcription of the tryptophan operon by purified RNA polymerase in the presence of partially purified repressor and tryptophan. Nature New Biology 245, 133-137 (1973).

20. Miller, O.L., Hamkalo, B.A., Thomas, C.A.: Visualization of bacterial genes in action. Science 169, 392-395 (1970).

21. Stretton, A.O.W., Brenner, S.: Molecular consequences of the amber mutation and its suppression. J. Mol. Biol. 12, 456-465 (1965).

22. Webster, R.E., Winter, R.B.: Rate of the message-ribosome complex upon translation of termination signals. J. Mol. Biol. 42, 425-439 (1969).

23. [illegible], G., Weber, K., Gros, F.: CR Acad. Sc., 261, 1007 (1965).

24. Imamoto, F., Yanofsky, C.: Transcription of the tryptophan operon in polarity mutants of E.coli. J. Mol. Biol. 28, 1-36 (1967).

25. Morse, D.E., Yanofsky, C.: Polarity and the degradation of m-RNA. Nature 224, 329-331 (1969).

26. Morse, D.E., Primakoff, P.: Relief of polarity in E.coli by "suA". Nature 226, 28-31 (1970).

27. [illegible]: "De-synchronized" mRNA for the tryptophan operon? An effect of Chloramphenicol. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 495-496 (1970).

28. Morse, D.E., Guertin, M.: Regulation of mRNA utilization and degradation by amino-acid starvation. Nature New Biology 232, 165-169 (1971).

29. Kuwano, M., Schlessinger, D., Morse, D.E.: Loss of dispensable endonuclease activity in relief of polarity by suA. Nature New Biology 231, 214-217 (1971).

30. Imamoto, F.: Evidence for premature termination of transcription of the tryptophan operon in polarity mutants of E.coli. Nature 223, 232-235 (1970).

31. Imamoto, F., Kano, Y., Tani, S.: Transcription of the tryptophan operon in nonsense mutants of E.coli. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 471-490 (1970).

32. Imamoto, F., Kano, Y.: Inhibition of transcription of the tryptophan operon in E.coli by a block in initiation of translation. Nature New Biology 232, 169-173 (1971).

33. Ozaki, M., Mizushima, S., Nomura, M.: Identification and functional characterization of the protein controlled by the streptomycin-resistant locus in E.coli. Nature 222, 333-339 (1969).

34. Nomura, M., Mizushima, S., Ozaki, M., Traub, P., Lowry, C.V.: Structure and function of ribosomes and their molecular components. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 49-61 (1969).

35. Craig, E.: Synthesis of specific, stabilized messenger RNA when translocation is blocked in E.coli. Genetics 70, 331-336 (1972).

36. Mackie, G., Wilson, D.B.: Polarity and transcription in the galactose operon of E.coli. Biochem. Biophys. Res. Commun. 48, 226-234 (1972).

37. Shin, D.H., Moldave, K.: Effect of ribosomes on the biosynthesis of RNA in vitro. J. Mol. Biol. 21, 231-245 (1966).

38. Brown, J.C., Doty,P.: Protein factor requirement for binding of messenger RNA to ribosomes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 30, 284-291 (1968).

39. Leavitt, J.C., Moldave, K., Nakada, D.: Stimulation of in vitro RNA synthesis by ribosomes and ribosomal proteins. J.Mol. Biol. 70, 15-40 (1972).

40. Geiduschek, P., Haselkorn, R.: Messenger RNA. Ann. Rev. Biochem. 38, 647-676 (1969).

41. Imamoto, F.: Diversity of regulation of genetic transcription. J. Mol. Biol. 74, 113-136 (1973).

42. Varmus, H.E., Perlman, R.L., Pastan, J.: Regulation of lac transcription in antibiotic-treated E.coli. Nature New Biology 230, 41-44 (1971).

43. Dütting, D., Hübner, L.: The effect of antibiotics on the in vivo synthesis of mRNA from the lactose operon of E.coli. Molec. Gen. Genet. 116, 277-290 (1972).

44. Morse, D.E.: Polarity induced by Chloramphenicol and relief by suA. J. Mol. Biol. 55, 113-118 (1971).

45. Imamoto, F., Tani, S.: Diversity of regulation of genetic transcription. Nature New Biology 240, 172-175 (1972).

46. Sly, W.S., Echols, H., Adler, J.: Control of viral messenger RNA after lambda phage infection and induction. Proc. Nat. Acad. Sci. 53, 378-385 (1965).

47. Taylor, K., Hradecnas,Z., Szybalski, W.: Asymmetric distribution of the transcribing regions on the complementary strands of coliphage λ DNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 57, 1618-1625 (1967).

48. Schaller, H., Otto, B., Nüsslein, V., Huf, J., Herrmann, R., Bonhoeffer, F.: Deoxyribonucleic acid replication in vitro. J. Mol. Biol. 63, 183-200 (1972).

49. Shapiro, J., Machattie, L., Eron, L., Ihler, G., Ippen, K., Beckwith, J.: Isolation of pure lac operon DNA. Nature 224, 768-774 (1969).

50. Hersey, D.A.: The Bacteriophage λ (CSH 1971).

51. Winslow, R.M., Lazzarini, R.A.: The rates of synthesis and chain elongation of RNA in E.coli. J. Biol. Chem. 244, 1128-1137 (1969).

52. Silverstone, A.E., Arditti, R.R., Magasanik, B.: Catabolite-insensitive revertants of lac promoter mutants. Proc. Nat. Acad. Sci. 66, 773-779 (1970).

53. Arditti, R., Grodzicker, T., Beckwith, J.: Cyclic adenosine monophosphate-independent mutants of the lactose operon of E.coli J. Bacteriol. 114, 652-655 (1973).

54. Luzzatto, L., Apirion, D., Schlessinger, D.: Mechanism of action of Streptomycin in E.coli: interruption of the ribosome cycle at the initiation of protein synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. 60, 873-880 (1968).

55. Modolell, J., Davis, D.: Breakdown by Streptomycin of initiation complexes formed on ribosomes of E.coli. Proc. Nat. Acad. Sci. 67, 1148-1155 (1970).

56. Wallace, B.J., Davis, B.D.: Cyclic blockade of initiation sites by Streptomycin-damaged ribosomes in E.coli: an explanation for dominance of sensitivity. J. Mol. Biol. 75, 377-390 (1973).

57. Wallace, B.J., Tai, P.Ch., Davis, B.D.: Effect of Streptomycin on the response of E.coli ribosomes to the dissociation factor. J. Mol. Biol. 75, 391-400 (1973).

58. Miskin, R., Zamir, A.: Effect of Streptomycin on ribosome interconversion, a possible basis for the action of the antibiotic. Nature New Biology 238, 78-80 (1972).

59. Weisblum, B., Davies, J.: Antibiotic inhibitors of the bacterial ribosomes. Bacteriol. Rev. 32, 493-528 (1968).

60. Fernandez-Muñoz, R., Monro, R.E., Torres-Pinedo, R., Vasquez, D.: Substrate- and antibiotic-binding sites at the peptidyl-transferase centre of E.coli ribosomes. Eur. J. Biochem. 23, 185-193 (1971).

61. Nierhaus, D., Nierhaus,K.H.: Identification of the Chloramphenicol-binding protein in E.coli ribosomes by partial reconstitution. Proc. Nat. Acad. Sci. 7o, 2224-2228 (1973).

62. Gurgo, C., Apirion, D., Schlessinger, D.: Effects of Chloramphenicol and Fusidic acid on polyribosome metabolism in E.coli. FEBS LETTERS 3, 34-36 (1969).

63. Pestka, S.: Inhibitors of ribosome functions. Ann. Rev. Microbiol. 25, 487-520 (1971).

64. Joung, R.M., Nakada, D.: Defective ribosomes in Chloramphenicol-treated E.coli. J. Mol. Biol. 57, 457-473 (1971).

65. Legault-Demare, L., Jeantet, C., Gros, F.: Metabolic fate of initiation factors after inhibition of protein synthesis in E.coli. Molec. Gen. Genet. 125, 301-318 (1973).

66. Nathans, D.: Puromycin inhibition of protein synthesis. Proc. Nat. Acad. Sci. 51, 585-592 (1964).

67. Tanaka, S., Jgarashi, K., Kaji, A.: Studies on the action of Tetracyclin and Puromycin. J. Biol. Chem. 247, 45-50 (1972).

68. Spirin, A.S.: A model of the functioning ribosome: Locking and unlocking of the ribosome subparticles. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 197-207 (1969).

69. Kaempfer, R., Meselson, M.: Studies on ribosomal subunit exchange. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 34, 209-222 (1969).

70. Beckwith, J.: Restoration of operon activity by suppressors. Biochem. Biophys. Acta 76, 162-164 (1963).

71. Yankofsky, S.A., Spiegelman, S: The identification of the ribosomal RNA cistron by sequence complementarity (I, II). Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 1069-1078, 1466-1472 (1962).

72. Giacomoni, D., Spiegelman, S.: Origin and biologic individuality of the genetic dictionary. Science 138, 1328-1331 (1962).

73. Goodman, H.M., Rich, A.: Formation of a DNA-soluble RNA hybrid and its relation to the origin, evolution and degeneracy of soluble RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. 48, 2101-2109 (1962).

74. Kennell, D.: Titration of the gene sites on DNA by DNA: RNA hybridization. II. The E.coli chromosome. J. Mol. Biol. 34, 85-103 (1968).

75. Pato, M.L., Meyenberg, K.: Residual RNA synthesis in E.coli after inhibition of initiation of transcription by rifampicin. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 497-504 (1970).

76. Mangiarotti, G., Schlessinger, D.: Polyribosome metabolism in E.coli. J. Mol. Biol. 29, 395-418(1967).

77. Kennell, D.: Inhibition of host protein synthesis during infection of E.coli by bacteriophage T4. J. Virol. 6, 208-217 (1970).

78. Mangiarotti, G., Turco, E.: Ribonuclease activity in E.coli polyribosomes. Eur. J. Biochem. 38, 507-515 (1973).

79. Morikawa, N., Imamoto, F.: Degradation of tryptophan messenger. Nature 223, 37-40 (1969).

80. Morse, D., Mosteller, R., Baker, R.F., Yanofsky,Ch.: Direction of in vivo degradation of tryptophan mRNA. Nature 223, 40-43 (1969).

81. Schwartz, T., Craig, E., Kennell, D.: Inactivation and degradation of messenger RNA from the lactose operon of E.coli. J. Mol. Biol. 54, 299-311 (1970).

82. Mosteller, R.D., Rose, J.K., Yanofsky, Ch.: Transcription initiation and degradation of trp-mRNA. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35, 461-466 (1970).

83. Marrs, B.L., Yanofsky, Ch.: Host and bacteriophage specific mRNA degradation in T7-infected E.coli. Nature New Biology 234, 168-170 (1971).

84. Blundell, M., Craig, E., Kennell, D.: Decay rates of different mRNA in E.coli and models of decay. Nature New Biology, 238, 46-49 (1972).

85. Forchhammer, J., Jackson, E.N., Yanofsky, Ch.: Different half-lives of messenger RNA corresponding to different segments of the tryptophan operon of E.coli. J. Mol. Biol. 71, 687-699 (1972).

86. Sedat, J., Lyon, A., Sinsheimer, L.: Purification of E.coli pulslabeled RNA by benzoylated DEAE-Cellulose chromatography. J. Mol. Biol. 44, 415-434 (1969).

87. Imaizumi, T., Diggelmann, H., Scherrer, K.: Demonstration of globin messenger sequences in giant nuclear precursors of mRNA of avian erythroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. 70, 1122-1126 (1973).

88. Sussman, R., Jacob, F.: Sur un système de répression thermo-sensibel chez le bactériophage λ d'E.coli. C.R. Acad. Sci. 254, 1517 (1962).

89. Kaiser, A.D., Jacob, F.: Recombination between related temperate bacteriophages and the genetic control of immunity and prophage localization. Virology 4, 509-527 (1957).

90. Revel, M., Greenshpan, H., Herzberg, M.: E.coli initiation factors in the binding of ribosomes to messenger RNA. Methods in Enyzmology xx, 271-273 (1971).

91. Solymosy, F., Fedorcsák, J., Gulyás, A., Farkas, G.L., Ehrenberg, L.: A new method based on the use of diethyl pyrocarbonate as a nuclease inhibitor for the extraction of undegraded nucleic acids from plant tissues. Europ. J. Biochem. 5, 520-527 (1968).

92. Hradecnas, Z., Szybalski, W.: Fractionation of the complementary strands of coliphage λ DNA based on the asymmetric distribution of the poly J,G-binding sites. Virology 32, 633-643 (1967).

93. Bishop, J.O.: Examination of an equilibrium interpretation of DNA-RNA hybridization data. Biochem. J. 116, 223-228 (197o).

94. Landy, A., Abelson, J., Goodman, H.M., Smith, J.D.: Specific hybridization of tyrosine tRNA's with DNA from a transducing bacteriophage ø 80 carrying the amber suppressor gene su III. J. Mol. Biol. 29, 457-471 (1967).

95. Blüthmann, H., Brück, D., Hübner, L., Schöffski, A.: Reassociation of nucleic acids in solutions containing formamide. Biochem. Biophys. Res. Commun. 50, 91-97 (1973).

96. Staynov, D.Z., Pinder, J.C., Gratzer, W.B.: Molecular weight determination of nucleic acids by gel electrophoresis in non-aqueous solution. Nature New Biology 235, 108-110(1972).

Lebenslauf

5.12.42	Geboren in Prag
1949-1953	Volksschule in Bad Aibling
1953-1954	Volksschule in Ditzingen
1954-1963	Gymnasium Stuttgart-Zuffenhausen
Februar 1963	Abitur
1963-1970	Biochemiestudium in Tübingen
WS 68/69	Diplomprüfung in Biochemie
Mai bis Dez. 69	Diplomarbeit am Physiologisch-chemischen Institut bei Herrn Prof. Dr. U. Weser, Thema der Arbeit: "Reaktivität einiger Übergangsmetallionen auf die nukleare RNA-Biosynthese in Rattenleber".
März 70 bis Juli 73	Dissertation am Max-Planck-Institut für Virusforschung (Dir. Prof. Dr. A. Gierer) unter Anleitung von Herrn Priv. Doz. Dr. D. Dütting, Thema der Arbeit: "Zur Frage der Kopplung von Transkription und Translation im Lactose-Operon von Escherichia coli".

Meine akademischen Lehrer waren:

E. Bayer
W. Bues
U. Feine
M. Hanack
H. Krüger
H. Metzner
E. Müller
F. Schneider
E. Stumpp
H. Zähner

F. Bonhoeffer
H. Diekmann
K.G. Grell
E. Kallee
F. Lingens
F.P. Möhres
W. Rüdorff
V. Schwartz
G. Weitzel

E. Bünning
D. Dütting
A. Gierer
G. Kortüm
H. Mauser
K. Mörike
W. Seyffert
W. Schweitzer
U. Weser